FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1968

N°

THESE 619

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d' Etat)

PAR

MATHIEU-SAINT-LAURENT Patrice

Externe des Hôpitaux de Paris

Né le 8 Juillet 1939 à ORAN (Dpt. d' Oran)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

La STRUCTURE des BACTERIES

PRÉSIDENT : MONSIEUR LE PROFESSEUR M. R. FASQUELL

ROGER VEZIN - 48, rue de la Santé - PARIS XIV^e

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1968 N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d' Etat)

PAR

MATHIEU-SAINT-LAURENT Patrice

Externe des Hôpitaux de Paris

Né le 8 Juillet 1939 à ORAN (Dpt. d' Oran)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :

La STRUCTURE des BACTERIES

PRÉSIDENT : MONSIEUR LE PROFESSEUR M. R. FASQUELLE

ROGER VEZIN - 48, rue de la Santé - PARIS XIV^e

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1er/3/1968

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Bénard (H.), Bernard (E.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Cheymol (J.), Coste (F.), Debré (R.), Dechaume (M.), Galliard (H.), Gaudard d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Giroud (A.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lacomme (M.), Lamy (M.), Laroche (G.), Lelong (M.), Lévy (Mlle J.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Maduro (R.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Turpin (R.), Verne (J.).

DOYEN	Georges BROUET
1er ASSESSEUR	Daniel BARGETON
2e ASSESSEUR	Jean GOSSET

A. — CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
—	HUARD (P.)
à titre personnel	CABROL (Ch.)
— —	OLIVIER (G.)
Anatomie et Cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
à titre personnel	NEZELOF (Ch.)
— —	ORCEL (L.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
— —	DESGREZ (P.)
— —	POLONOVSKI (J.)
Chimie Pathologique	SCHAPIRA (G.)
à titre personnel	CARTIER (P.)
— —	DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale (à titre personnel)	BOURLIÈRE (F.)
— —	HARTMANN (L.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
— —	DJOURNO (A.)
— —	DOGNON (A.)
à titre personnel	KELLERSHOHN (L.)
— —	GOUGEROT (L.)
— —	ROUCAYROL (J.-Cl.)
Cancérologie expérimentale	MATHÉ (G.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histologie et Embryologie	COUJARD (R.)
— —	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
à titre personnel	RAGADOT (J.)
Microbiologie	FASQUELLE (R.)
Bactériologie et Virologie	TOURNIER (P.)
à titre personnel	BARBIER (P.)

	MM.
Parasitologie	LARIVIÈRE (M.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
à titre personnel	LŒPER (J.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.-R.)
—	LECHAT (P.)
Physiologie	BARGETON (D.)
—	MALMEJAC (J.)
—	PARROT (J.)
à titre personnel	DEJOURS (P.)
Physiologie et biologie appliquée aux sports	SCHERRER (J.)

B. — CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

1° MÉDECINE

Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Histoire de la Médecine et de la Chirurgie	COURY (Ch.)
Hygiène et Médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale, droit médical et déontologie	DEROBERT (L.)
Pathologie exotique	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie médicale	BUGE (A.)
— —	BRICAIRE (H.)
— —	CORNET (A.)
— —	HOUSSET (E.)
— —	LAROCHE (Cl.)
à titre personnel	AZERAD (E.)
— —	BOUR (H.)
— —	BROCARD (H.)
— —	CAROLI (J.)
— —	FACQUET (J.)
— —	LAMBLING (A.)
— —	LAUNAY (Cl.)
— —	PAYET (M.)
— —	PERRAULT (M.)
— —	SIGUIER (F.)
— —	WORMS (R.)
— —	BOUVIER (J.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et Thérapeutique générales	MAURICE (P.)
Thérapeutique	LAMOTTE (M.)
Thérapeutique appliquée	MARCHE (J.)

Chaires de Cliniques :

Clinique cardiologique (Boucicaut)	LENÈGRE (J.)
— — (Broussais)	SOULIÉ (P.)

	MM.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
à titre personnel	BASTIN (R.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
à titre personnel (neuro-psychiatrie)	PICHOT (P.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
à titre personnel	LHERMITTE (F.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	BERNARD (J.)
à titre personnel (hématologie)	ANDRÉ (R.)
— — —	BOUSSER (J.)
— — —	DREYFUS (B.)
Cliniques médicales — Bicêtre	DEPARIS (M.)
Cliniques médicales — Broussais	MILLIEZ (P.)
Cliniques médicales — Cochin	PÉQUIGNOT (H.)
Cliniques médicales — Hôtel-Dieu	BARIETY (M.)
Cliniques médicales — Pitié	DREYFUS (G.)
Cliniques médicales — Saint-Antoine	BOUDIN (G.)
Cliniques médicales — Saint-Antoine —	CONTE (M.)
Cliniques médicales — Saint-Antoine —	KOURILSKY (R.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique et Séméiologie médicales (Antoine-Chantin)	DOMART (A.)
Séméiologie médicale (Lariboisière)	BOUVRAIN (Y.)
— — (Pitié)	RAMBERT (P.)
— — (Rothschild)	WOLFROMM (R.)
Clinique d'Hydrologie et de Climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
à titre personnel	GIBERTON (A.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies métaboliques (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique néphrologique (Necker)	HAMBURGER (J.)
à titre personnel	RICHET (G.)
— —	CROSNIER (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	ROYER (P.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)	MOZZICONACCI (P.)
Clinique médicale infantile et de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pédiatrie (Trousseau)	BRISSAUD (H.)
à titre personnel	LESOBRE (R.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	THIEFFRY (S.)

	MM.
Hygiène et Clinique de la première enfance (Trousseau)	LAPLANE (R.)
à titre personnel	POLONOVSKI (Cl.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BROUET (G.)
à titre personnel	KREIS (B.)
— —	MEYER (A.)
Clinique de rééducation motrice	GROSSIORD (A.)
Electroradiologie	LEDOUX-LEBARD (M.)
—	LEFEBVRE (J.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
à titre personnel	FISCHGOLD (H.)
— —	TUBIANA (M.)
— —	CHERIGIE (E.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	DELBARRE (F.)
Clinique rhumatologique (Lariboisière)	SÈZE (S. de)
Clinique toxicologique (Fernand-Widal)	GAULTIER (M.)

2° CHIRURGIE

Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
— —	KUSS (R.)
— —	N...
à titre personnel	RAMADIER (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	MORIN (P.)
Technique chirurgicale et chirurgie expérimentale	MONSAINGEON (A.)

Chaires de Cliniques :

Clinique carcinologique (Gustave-Roussy)		DENOIX (P.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)		REDON (H.)
à titre personnel		BRÉHANT (J.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.-L.)
	—	BAUMANN (J.)
	Cochin	LÉGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Saint-Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
	Tenon	OLIVIER (Cl.)

	MM.
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais)	POILLEUX (F.)
— — — (Saint-Louis)	DEBEYRE (J.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)	MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
— — — — (Foch)	PADOVANI (P.)
— — — — (Beaujon)	CAUCHOIX (J.)
Clinique traumatologique et orthopédique (Raymond-Poincaré)	JUDET (R.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)	FÈVRE (M.)
à titre personnel	CHIGOT (P.-L.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie thoracique (Laennec)	MATHEY (J.)
à titre personnel	GAUDART D'ALLAINES (Cl. de)
Clinique chirurgicale et gynécologique (Broca)	HUGUIER (J.)
Clinique obstétricale (Baudelocque)	LEPAGE (F.)
— — (Saint-Antoine)	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
à titre personnel	LEBEAU (J.)
Clinique ophtalmologique (Cochin)	BRÉGEAT (P.)
— — (Hôtel-Dieu)	OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	DERNEA (P.)
Clinique urologique (Cochin)	ABOULKER (P.)
— — (Necker)	COUVELAIRE (R.)

C. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM.
Anatomie	GILLOT (Cl.)
Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)
Bactériologie	LE MINOR (L.)
Biochimie médicale	CARTIER (P.) GONNARD (P.) NORDMANN (J.)
Chirurgie	CERBONNET (G.)
Hématologie	BESSIS (M.) BILSKI-PASQUIER (G.)
Hygiène	BLANCHER (G.) CORRE-HURST (Mme L.)
Médecine légale	CECCAL P.) HADENGUE (A.) FOURNIER (E.)

	MM.
Médecine générale	AUSSANNAIRE (M.)
Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Neuro-psychiatrie	TARDIEU (G.)
Pédiatrie	ROSSIER (A.)
Physique médicale	COURSAGET (J.) GREMY (F.) PELLERIN (P.)
Physiologie	DURAND (J.) GIRARD (Fr.) HUGELIN (A.)
Stomatologie	CHAPUT (Mme A.)
Pharmacologie	SCHMITT (H.)

D. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

	MM.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

E. — PROFESSEURS ASSOCIÉS

Hormonologie	MORICARD (R.)
Statistique médicale et épidémiologie	SCHWARTZ (D.)
Néphrologie	MAXWELL (M.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseiller administratif	Mlle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque. Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine.	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Mme FORGET (F.), Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), Mlles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), LE QUANG LINH (G.), REUGE (M.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, *l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.*

ATTENTION

Ne pas omettre, **dans chaque exemplaire de thèse,** l'impression, après les conclusions, du **permis d'imprimer.** Le dépôt des **105** exemplaires (formats in-8° imprimé ou in-4° dactylographié) est effectué à la Bibliothèque qui en délivre reçu autorisant la consignation pour l'examen.

Les thèses, exceptionnellement dactylographiées en **6** exemplaires (dépôt provisoire sous réserve de l'impression ultérieure avant remise du diplôme de doctorat) ou en **105** exemplaires (dépôt définitif), doivent être de format in-4°, agrafées, paginées, recouvertes d'une chemise et comporter la même présentation. (Circulaires ministérielles du 5-1-1943 et du 23-7-1952).

Les exemplaires non conformes **ne sont pas admis au dépôt.**

M. 446 — Paris, Imp. Administrative Centrale, 8, rue de Furstenberg (1-68) U 1024

A mes Parents,

A ma soeur, à mon beau-frère,

A ma famille,

A mes amis.

A Monsieur le Professeur R. F A S Q U E L L E

Professeur de Microbiologie
à la Faculté de Médecine de PARIS ,
Biologiste de l'Hôtel - Dieu,
Membre de l'Académie de Médecine,

Qui a eu la bienveillance de m'accueillir
dans son Service à la Faculté ,

Je lui en garde une très grande reconnaissance,

Qu'il veuille bien trouver ici
l'expression de ma gratitude
et de mon profond respect .

A Monsieur le Professeur D. CHRISTOL

Biologiste de l'Hôpital Claude Bernard

En remerciement de l'excellente année
passée dans son Laboratoire ,
et de sa sollicitude à mon égard .

Qu'il trouve ici le témoignage de ma
profonde reconnaissance et
et de mon fidèle attachement.

A Monsieur le Professeur Agrégé J. D U V A L

Biologiste de l'Hôpital
BEAUJON

Dont l'enseignement éclairé, les conseils précieux
et l'indulgente sympathie sont à la base
de ce travail.

Qu'il trouve ici l'hommage de mon admiration,
de ma gratitude et de ma très respectueuse
amitié.

A MES MAITRES de la Chaire de MICROBIOLOGIE

de la FACULTE de MEDECINE de PARIS :

Monsieur le Professeur TOURNIER,

Monsieur le Professeur BARBIER,

Monsieur le Professeur LE MINOR,

Madame le Professeur Agrégé BERGOGNE,

Monsieur le Professeur Agrégé F. BRICOUT,

Monsieur le Professeur Agrégé C. CHANY,

Monsieur le Professeur Agrégé G. DAGUET,

Monsieur le Professeur Agrégé PH. GOULLET,

Monsieur le Professeur Agrégé H. MOLLARET,

Monsieur le Professeur Agrégé P. NEVOT,

En hommage à l'enseignement éminent

qu'ils m'ont prodigué.

A mes Maîtres d'Externat :

Monsieur le Docteur J. MEILLERE,

Monsieur le Professeur Agrégé S. BONFILS,

Monsieur le Docteur J. ANTONELLI,

Monsieur le Professeur D. CHRISTOL ,

En remerciement de ce qu'ils m'ont appris.

I N T R O D U C T I O N

Nos connaissances relatives à la structure des bactéries ont beaucoup progressé ces dernières années, grâce au perfectionnement de nos moyens d'investigation, à celui notamment des techniques d'examens en microscopie électronique : procédés de fixation des préparations, réalisations de coupes ultra-fines.

Les études menées grâce à ces techniques récentes ont abouti à une connaissance aujourd'hui approfondie de la cytologie bactérienne et, de ce fait, à une définition précise du monde bactérien, définition dont les meilleurs critères se révèlent être effectivement d'ordre cytologique.

C'est ainsi qu'ont pu être rattachés sans ambiguité aux bactéries certains groupes de microorganismes dont la position taxonomique restait incertaine ou bien est apparue inexacte : on peut aujourd'hui affirmer que les Spirochètes, les Actinomycètes, les Rickettsies sont des bactéries authentiques.

Que sont donc les bactéries ?

Les bactéries appartiennent au règne des Protistes, terme créé en 1866 par HAECKEL pour désigner les microorganismes que l'on était fort embarrassé pour classer dans l'un des deux règnes jusqu'alors admis, règne animal et règne végétal. Le règne des Protiste groupe ainsi l'ensemble des microorganismes, soit rigoureusement unicellulaires soit coenocytiques, soit même pluricellulaires, mais dans lesquels n'existent alors aucune différenciation en tissus.

Ainsi défini, le règne des Protistes constitue un ensemble fort complexe, comprenant algues et champignons inférieurs protozoaires, bactéries et algues bleues que l'on peut répartir en deux groupes:

- Protistes supérieurs ou Eucaryotes,
- Protistes inférieurs ou Procaryotes.

Les Protistes supérieurs ou eucaryotes comprennent :

- les Algues inférieures,
- les Champignons inférieurs,
- les Protozoaires

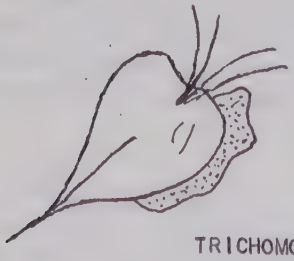
Les protistes inférieurs ou procaryotes correspondent précisément aux bactéries, terme proposé en 1857 par Ferdinand Cohn et qui, employé ainsi dans un sens large, groupe :

- les Bactéries au sens strict ou Schizonycètes
- et les Algues Bleues ou Cyanophycées ou Schizophycées

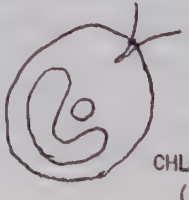
Notons que le terme de "microbes" proposé en 1877 par le chirurgien français Sédillot pour désigner les bactéries n'a jamais été défini avec précision et qu'il parait souhaitable actuellement de le considérer comme synonyme de Protistes.

La distinction entre Bactéries, protistes procaryotes et protistes eucaryotes a reposé tout d'abord sur des critères morphologiques observés en microscopie optique. Certes, dans la majorité des cas, cette simple observation microscopique suffit et il n'est pas besoin de posséder une longue expérience pour éviter toute confusion entre une bactérie et une levure ou un protozoaire.

Les quelques exemples suivants illustrent les rapports de taille et les différences nettes de morphologie :



TRICHOMONAS 10 µ



CHLAMYDOMONAS 10 µ
(algue)

AMIBE 10 µ à 20 µ

LEVURES GRAM + 4 µ

STAPHYLOCOQUE 1 µ

Mais ces critères purement morphologiques deviennent insuffisants dans les cas frontières, et ceci explique les difficultés que tous les auteurs ont éprouvé dans le passé à classer par exemple les Spirochètes ou les Rickettsies.

Les études biochimiques ont apporté quelques notions importantes. Certes, la composition chimique globale des bactéries, très complexe, est approximativement celle de toute cellule vivante ; l'eau constitue 70 à 90 % du poids frais et l'on y trouve glucides, lipides, protides, acides nucléiques.

Toutefois, quelques points sont à souligner :

- les Bactéries contiennent, comme toute cellule vivante, mais contrairement aux Virus, les deux types d'acides nucléiques.

- d'autre part, on note chez elles quelques particularités biochimiques : l'absence quasi-constante de stérols (à l'exception, il est vrai, des Mycoplasmes) et la présence dans leur paroi d'un mucopeptide particulier dont la composition chimique est propre aux bactéries.

Cependant, les éléments essentiels d'individualisation des bactéries nous ont été fournis par l'étude de leur structure intime telle que nous la révèle la microscopie électronique. De ce point de vue, la cellule bactérienne, cellule procaryote, s'oppose de façon très nette, par sa structure très particulière, à la cellule eucaryote des Protistes supérieurs ou des organismes plus évolués.

Notre exposé comprendra deux parties :

Dans une première partie consacrée à l'étude de la structure des Eubactéries, nous envisagerons successivement les différents éléments d'une cellule bactérienne typique (noyau, cytoplasme, membrane cytoplasmique, paroi, structures facultatives que sont la capsule, les flagelles, les pili et la spore) en les comparant aux structures homologues des cellules eucaryotes.

La deuxième partie sera consacrée à la description de la structure des bactéries dont la position systématique a donné lieu dans le passé à discussions, mais que l'on rattache aujourd'hui avec certitude au monde bactérien et nous analyserons les arguments sur lesquels se fonde ce rattachement.

PREMIERE PARTIE

STRUCTURE BACTERIENNE

CHAPITRE PREMIER

LE NOYAU

L'existence d'un noyau chez les bactéries a été longtemps discutée. Elle n'est prouvée de façon définitive que depuis une vingtaine d'années par différentes techniques microscopiques, et aussi par extraction chimique d'A D N chez les bactéries, et la localisation cytochimique de cet A D N au niveau de corps que l'on peut considérer comme des noyaux ou leur équivalent ("corps nucléaires" ou nucléoïdes).

MISE EN EVIDENCE DU NOYAU BACTERIEN

Nous savons maintenant pourquoi les recherches ont été si longtemps infructueuses.

Les bactéries contiennent dans leur cytoplasme des quantités exceptionnellement importantes d'ARN (25 % du poids sec chez E. coli) qui fixe avidement les colorants basiques et masque complètement la coloration de l'ADN du noyau, si l'on ne le détruit pas au préalable par un traitement spécifique.

Chez la plupart des autres organismes, le cytoplasme a certes une certaine affinité pour les colorants basiques, mais beaucoup moins marquée que le noyau, qui est coloré par ces produits beaucoup plus intensément.

Avant que ce fait ait été correctement interprété, il avait conduit à de fausses interprétations de la structure bactérienne :

- c'est ainsi que certains consideraient la cellule bactérienne entière comme l'équivalent du noyau d'un organisme supérieur.

- d'autres, pensaient que le matériel nucléaire était dans les bactéries réparti de façon diffuse, sous forme d'un réseau inframicroscopique.

Ces théories sont maintenant abandonnées et il est démontré que toute cellule bactérienne contient des corps intracellulaires qui possèdent les propriétés cytochimiques que l'on reconnait aux noyaux et que l'on voit se diviser en coordination avec la division cellulaire.

I.- TROIS PROCÉDÉS CYTOCHIMIQUES ONT ÉTÉ LARGEMENT UTILISÉS POUR DÉMONTRER L'EXISTENCE DU NOYAU BACTÉRIEN.

- Le plus spécifique est la réaction de FEULGEN, test microchimique permettant de révéler l'ADN et de le localiser dans la cellule.

  La préparation est traitée d'abord par de l'HCl dilué, ce qui hydrolyse, dégrade partiellement l'ADN et libère la fonction aldéhyde du désoxyribose.

  La préparation est alors traitée par le réactif de SCHIFF (fuschsine basique - décolorée par acide sulfureux).

  Une coloration rouge apparait là où se trouve du DNA. Le RNA ne se colore pas ainsi. (Certes, la présence d'aldéhyde d'autres origines est possible, ce qui pourrait fausser la réaction, mais on peut augmenter la spécifité pour le DNA, en traitant la préparation par l'hydroxylamine avant le temps d'hydrolyse).

- Les deux autres méthodes font appel à une destruction sélective préférentielle de l'ARN cytoplasmique, suivie d'une coloration par un colorant basique ordinaire.

  De cette façon, l'extrême basophilie du cytoplasme disparait et les structures nucléaires apparaissent bien colorées sur un fond plus clair.

  - L'ARN cytoplasmique peut être dégradé par hydrolyse acide (méthode de ROBINOW). Il y est relativement plus sensible que l'ADN. Ceci d'ailleurs est une question de degré et les conditions doivent être bien définies. On utilise en général acide minéral dilué tel que HCl normal 10 minutes à 60° C.

  - L'hydrolyse enzymatique de l'ARN (BOIVIN) par la ribonucléase est encore plus intéressante car plus spécifique. Elle montre bien que la basophilie du cytoplasme est due à l'ARN. Elle laisse le noyau coloré.

On peut d'ailleurs faire l'expérience inverse : traitement par désoxyribonucléase - le noyau n'est plus colorable - ce qui prouve bien qu'il est le siège de l'ADN.

2.- DEUX MÉTHODES PERMETTENT ENCORE DE METTRE EN EVIDENCE LE NOYAU EN MICROSCOPIE OPTIQUE.

- PIECHAUD : coloration directe par un éosinate d'azur de méthylène

- TULASNE : examen en microscopie à contraste de phase.

Les noyaux bactériens peuvent être vus sur cellules vivantes, en contraste de phase, à condition de suspendre les bactéries dans une solution protéique concentrée qui a un indice de réfraction proche de celui des cellules elles-mêmes. Ainsi le contraste de phase normalement important entre la cellule et le milieu, lorsque ce dernier est de l'eau, est alors presque totalement aboli et les contrastes de phase, minimes, des structures cellulaires internes prennent alors de l'importance. C'est ainsi que le noyau devient visible.

3.- ENFIN, MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Grâce au perfectionnement des techniques

- de coupes (coupes ultra-fines),

- de fixation (RYTER et KELLENBERGER)

= images très précises prouvant, sans contestation possible, l'existence d'un noyau bactérien et d'étudier avec précision sa structure intime.

Pour pouvoir comparer cette structure à celle du noyau eucaryote, rappelons la structure de celui-ci.

RAPPEL DE LA STRUCTURE DU NOYAU DES EUCARYOTES

La plupart des cellules eucaryotes ont un noyau

- unique
- elliptique ou sphérique le plus souvent, parfois à fer à cheval ou polylobé.
- situé à l'intérieur du cytoplasme qui l'entoure complètement.

Il est plus foncé, plus dense que le reste de la cellule.

A son intérieur, on distingue, au sein d'un milieu optiquement homogène (suc nucléaire ou caryolymphe) :

- un ou plusieurs nucléoles, toujours très visibles, car ils constituent la portion la plus réfringente de la cellule.
  Les nucléoles sont plus ou moins sphériques, à contours irréguliers.
  Au microscope électronique, ils ont l'aspect d'un réseau aux mailles plus ou moins fines et nombreuses.
  Ils ne sont pas limités par une membrane.
  Ils contiennent de l'ARN (3 à 7 %).
  Se colorent par les colorants acides.

- un réseau plus ou moins accentué, formé d'une substance qui a une grande affinité pour les colorants basiques (car constituée principalement d'ADN) : la chromatine.

- des masses plus ou moins nombreuses de chromatine : les caryosomes ou chromocentres.

Ce noyau des Eucaryotes est entouré d'une double membrane, d'une sorte de plèvre comportant :

- un feuillet nucléaire, collé au nucléoplasme.
- un feuillet cytoplasmique, collé au cytoplasme.
- entre les deux, l'espace périnucléaire (qui communique avec le réticulum endoplasmique).

mais cette "plèvre" est interrompue en de nombreux endroits par de petites zones circulaires d'accollement ou "pores". Ceux-ci la plupart du temps, semblent fermés, mais il n'est pas impossible qu'ils puissent s'ouvrir et faire communiquer ainsi le cytoplasme avec le noyau.

Enfin, lors de la division cellulaire, la chromatine s'organise en unités bien organisées - les chromosomes - supports des gènes.

Chaque chromosome se réplique et la répartition égale des deux lots chromosomiques se fait par le phénomène de la MITOSE.

LE NOYAU BACTERIEN

I.- Sa Forme

Les noyaux bactériens apparaissent généralement comme des éléments sphériques

- ou allongés en bâtonnets
- ou en haltère
- ou en forme de V

fréquemment associés par deux.

Il faut noter que l'on observe habituellement au moins 2 de ces structures et quelquefois 4 par cellule.

A première vue, on pourrait en déduire que les cellules bactériennes sont pluri-nucléées mais il est plus vraisemblable que l'interprétation correcte de ce fait est probablement la suivante : dans une population bactérienne en état de multiplication active, la division nucléaire précède, va plus vite que la division cellulaire elle-même. En somme, ce que l'on considère comme une bactérie, un bacille, est souvent en fait une cellule en train de se diviser en 2, voire 2 cellules encore unies et en train de devenir 4. Dans les cultures en phase stationnaire, on observe beaucoup plus de cellules mononucléées.

La forme du noyau peut varier en fonction de divers facteurs :

- concentration en NaCl du milieu.
  - fortes concentrations = noyaux globuleux, denses, massifs.
  - absence de NaCl = noyau très dispersé.
- milieux carencés = noyaux allongés.
- irradiation par les ultra-violets ou les rayons X = noyaux étalés, pseudofragmentés avec extrusions nombreuses dans le cytoplasme.

- les doses subléthales d'auréomycine ou de chloramphénicol = au contraire un corps nucléaire régulièrement sphérique ou ellipsoïdal, avec parfois un corps central exactement au centre.

2.- Sa Structure Intime

telle que la révèle la microscopie électronique, fait son originalité et l'oppose point par point au noyau des eucaryotes.

1.- LE NOYAU BACTERIEN N'EST LIMITE PAR AUCUNE MEMBRANE -

On le voit parfaitement sur les coupes ultra-fines.

Pourtant, cela ne veut pas dire que la séparation noyau-cytoplasme ne soit pas nette. Elle l'est, mais ceci n'est pas la conséquence de l'existence d'une membrane, mais très probablement ce fait dépend de la consistance du noyau et du cytoplasme, ou au moins de ce dernier, qui doit se trouver toujours à l'état de gel.

2.- IL A UNE STRUCTURE FIBRILLAIRE -

En microscopie électronique, la région nucléaire, de densité variable, en général moins dense que le cytoplasme, apparait remplie de filaments fins de 30 à 80 Å de diamètre.

Ces filaments forment généralement une sorte de feutrage,

- parfois, ils sont orientés parallèlement, constituant des faisceaux.

- d'autres fois encore, ils offrent une structure stratifiée très régulière.

On ignore si ces différents aspects reflètent une organisation réelle du noyau, correspondant à différents états nucléaires.

Ceci est la seule structure visible du noyau : jamais on observe quelque chose qui rappelle, à quelque stade que ce soit, les chromosomes des cellules eucaryotes. on n'observe pas non plus de formation comparable à un nucléole.

3.- A QUOI CORRESPONDENT CES FILAMENTS ?

Il est très probable que ces filaments ne soient pas des artéfacts, mais qu'ils représentent plus ou moins fidèlement un filament de DNA pelotonné.

Mais, on a d'autres informations sur le noyau bactérien, grâce à des recherches poursuivies dans trois directions :

- chimique,
- génétique,
- morphologique.

1.- CHIMIE -

Le premier but est d'obtenir des noyaux isolés pour pouvoir les analyser. Malheureusement, ceci est très difficile, à partir de cellules rompues, puisque le noyau bactérien n'est pas limité par une membrane. Lors des tentatives d'extraction, les constituants du noyau tendent évidemment à se mélanger aux constituants cytoplasmiques.

L'opinion résultant des travaux actuels est que le noyau bactérien est constitué de DNA (une seule molécule), ceci est bien établi.
Mais on discute pour savoir si le DNA est associé à autre chose, notamment à des protéines basiques de type protamine et histone comme dans la cellule eucaryote. Il semble que non.

2.- GENETIQUE -

Rappelons que JACOB et WOLLMANN ont, d'après les travaux de génétique, émis l'hypothèse que l'ensemble des gènes de la bactérie devaient être alignés sur un même groupe de liaison circulaire.
Ce qui, nous allons le voir, est vérifié par les études morphologiques.

3.- ETUDES MORPHOLOGIQUES -

Ce filament de DNA pelotonné, on a essayé bien entendu de le dérouler et de le voir, du moins de le photographier. On y est parvenu récemment de 2 façons :

- KLEINSCHMIDT et ses collaborateurs, sur Micrococcus lysodeikticus, provoquent la lyse de protoplastes à la surface d'un film monomoléculaire de protéine à l'interface air-eau.

Dans ces conditions, le DNA libéré est dispersé très doucement sur le film protéique auquel il s'adsorbe et il peut être facilement photographié après ombrage au microscope électronique.

On peut s'arranger pour que le DNA d'une seule bactérie puisse être observé dans une zone déterminée, de taille convenable.
Dans ces conditions, on a pu obtenir de très belles images de fibrilles constitutives du noyau bactérien.

Ce filament apparait très long, d'un diamètre compatible avec celui d'une double hélice de DNA. Mais dans les images obtenues, on observe encore un enchevêtrement de ces fibrilles, avec différents points en étoilé, d'où elles s'échappent et il est bien difficile de savoir si ces points correspondent à des artéfacts ou non ; en tout cas, on voit très peu d'extrémités libres.

CAIRNS et ses collaborateurs utilisent une méthode différente : l'AUTORADIOGRAPHIE.

Il faut d'abord cultiver les bactéries dans un milieu contenant de la Thymine marquée.

La thymine, précurseur du seul DNA, peut être rendue radioactive et marquée par un radioisotope de l'hydrogène H_3, le tritium.
Cultivées dans un milieu contenant de la thymine marquée par H_3, les bactéries fabriquerons un DNA radioactif.

Si donc une préparation de ces bactéries est ensuite mise en contact avec une plaque photographique, les structures radioactives impressionneront la plaque et seront visibles.

CAIRNS et ses collaborateurs ont pratiqué l'expérience suivante :

- des bactéries (Escherichia coli) sont cultivées dans un tel milieu contenant de la thymine marquée,
- puis placées dans une petite capsule limitée sur une face par une membrane semi-perméable où elles sont traitées par :
- un enzyme, le lysozyme, associé à un détergent, ce qui a pour effet de lyser les bactéries (en présence d'un excès de DNA non marqué de phage T2 qui agit comme protecteur, en "supportant" les molécules marquées).
  Après ce traitement, l'enzyme, le détergent et les débris cellulaires sont éliminés par diffusion à travers la membrane par une solution saline. Restent alors les filaments de DNA. La membrane est alors percée, la solution saline s'écoule lentement et dépose les fragments de DNA sur la membrane.
- La membrane est déposée sur une lame pour examen microscopique et, puis lorsqu'elle est sèche, recouverte d'une émulsion photographique (sensible aux électrons émis par le tritium), on l'abandonne ainsi 2 mois, puis on la développe.

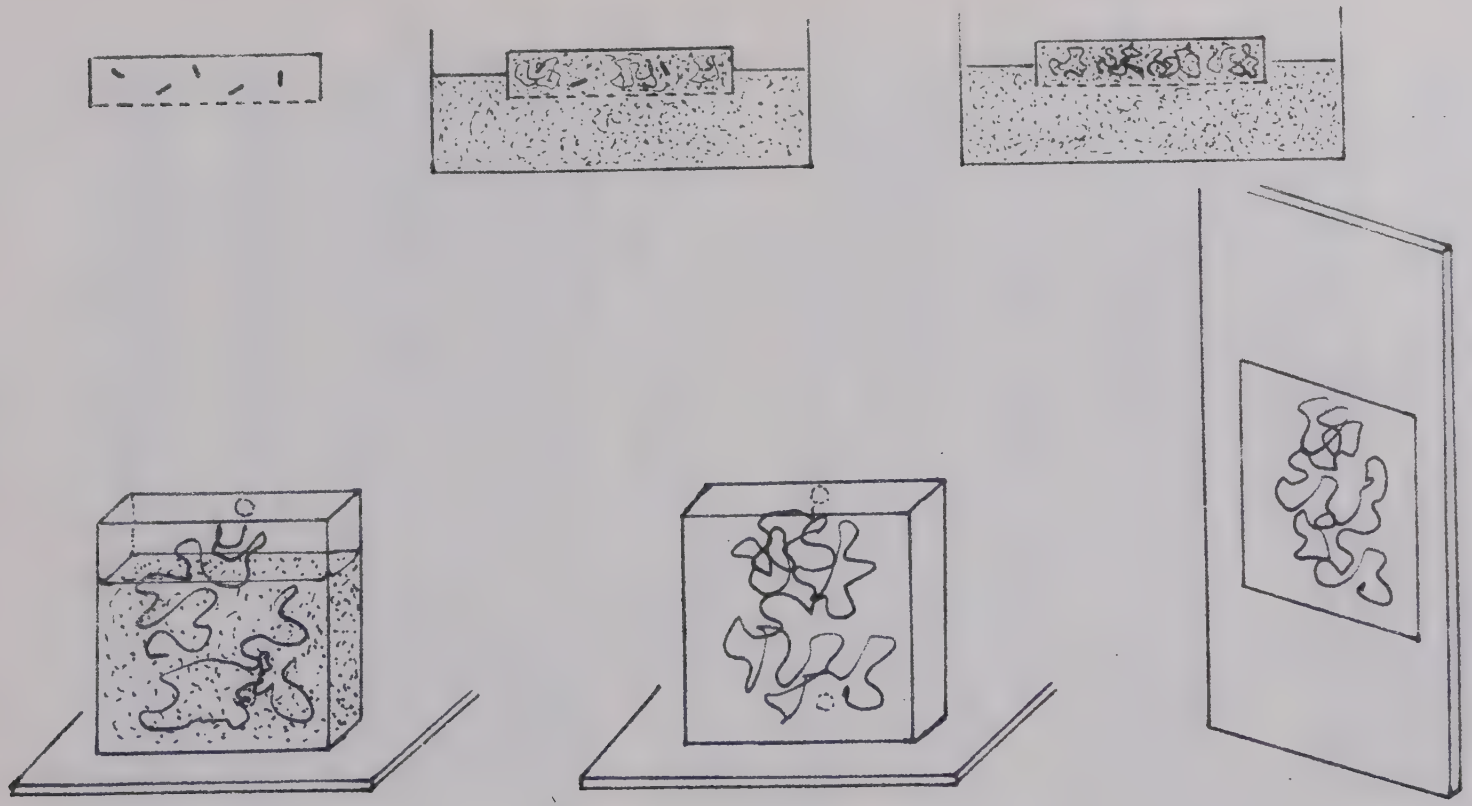
Les résultats sont surprenants :

Certes, on observe de nombreux filaments rompus, mais aussi des images remarquables ont été obtenues et qui montrent :

Le DNA d'un noyau d'Escherichia coli apparaissant sous la forme d'un filament unique et circulaire.

Ce filament représente une unique molécule de DNA d'environ 1 millimètre de longueur, et dont le poids moléculaire calculé est d'environ 2 milliards.

C'est de loin, la plus grande molécule connue dans un système biologique.



Autoradiographie (CAIRNS)

(contrairement à la microscopie électronique, l'autoradiographie ne permet pas de mesurer la largeur de la chaine).

Cette molécule est faite d'une double chaine polynucléotidique qui se sépare au moment de la duplication.

Ceci est très remarquable et aussi très satisfaisant, car avant ces travaux, les connaissances que nous avions acquises pour la génétique bactérienne, grâce aux travaux de JACOB et WOLLMANN sur Escherichia coli, avaient abouti à la conclusion que tous les constituants génétiques de la bactérie devaient être disposés linéairement le long d'un unique groupe de liaison, probablement circulaire, le long en somme d'un unique chromosome.

Cet unique chromosome, qui représente probablement à lui seul tout le noyau bactérien, nous le voyons sur ces autoradiographies.

4.- LA DIVISION DE NOYAU BACTÉRIEN

Pendant longtemps on a pensé que les différents aspects observés du noyau bactérien correspondaient à différentes étapes du cycle de division, étapes analogues aux phases de la mitose.

On sait aujourd'hui qu'il n'en est rien.

Le perfectionnement des techniques et notamment l'observation en contraste de phase, de bactéries vivantes, en train de se diviser, a permis de suivre le processus de division nucléaire, sans introduire d'artéfact de préparation.

On a pu ainsi conclure que le noyau bactérien se divise par simple scission et que la bactérie ne possède pas d'appareil mitotique, équivalent de celui des organismes supérieurs.

Ceci est un caractère de différence supplémentaire entre Procaryote et Eucaryote.

Cette absence de mitose se comprend d'ailleurs aisément dans la mesure où il n'existe qu'un seul groupe de liaison des éléments génétiques, qu'un seul chromosome.

Dans une cellule où l'information génétique est répartie entre plusieurs chromosomes, ce qui est le cas universel chez les Eucaryotes, une équipartition règulière des gènes pendant la division du noyau est impensable sans un appareil qui coordonne et gouverne avec beaucoup de précision la séparation des deux groupes complémentaires de chromosomes, en un mot sans un appareil mitotique.

Mais, quand l'information génétique est portée par un seul élément de structure, comme c'est le cas pour le chromosome circulaire d'Escherichia coli, une équipartition régulière peut se produire par un mécanisme plus simple ;

A-t-on quelques précisions sur ce mécanisme ?

Oui, à deux niveaux :

1.- AU NIVEAU MOLECULAIRE -

Revenons à l'expérience de CAIRNS.

Parmi les images obtenues en autoradiographie, il en est qui montrent à l'évidence le chromosome bactérien en train de se dupliquer. Manifestement, les deux chaines de DNA se séparent au moment de la duplication. Cette duplication commence en un point et progresse le long de la chaine, le long de la molécule.
Ceci se déduit de séries d'autoradiographies faites en laissant les bactéries dans le milieu de culture avec thymine marquée pendant un temps déterminé. Seuls des fragments de chaine de DNA sont marqués et on les repère.

Une difficulté : le DNA est fait d'une double hélice et le chromosome est circulaire.

Ainsi que le montrent les autoradiographies, le chromosome en train de se repliquer n'est pas en Y.

Au contraire, les extrémités des molécules-filles sont liées aux "extrémités" de la molécule-mère. Il est vraisemblable qu'à partir du point où débute la replication la molécule-mère subit un mouvement de rotation qui aboutit à l'autre extrémité à la détorsion des deux chaines, selon un mécanisme pour l'instant inconnu.

2.- AU NIVEAU CELLULAIRE -

La scission en deux d'un noyau est en liaison avec l'accroissement de la membrane. Le noyau est, en effet, lié à la membrane cytoplasmique (chapitre suivant).

Au total :

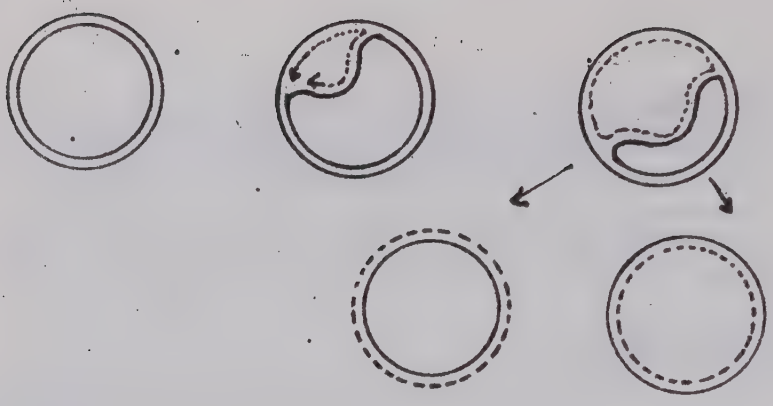
Le noyau de la cellule procaryote diffère nettement de celui de la cellule eucaryote.

Contrairement à ce dernier :

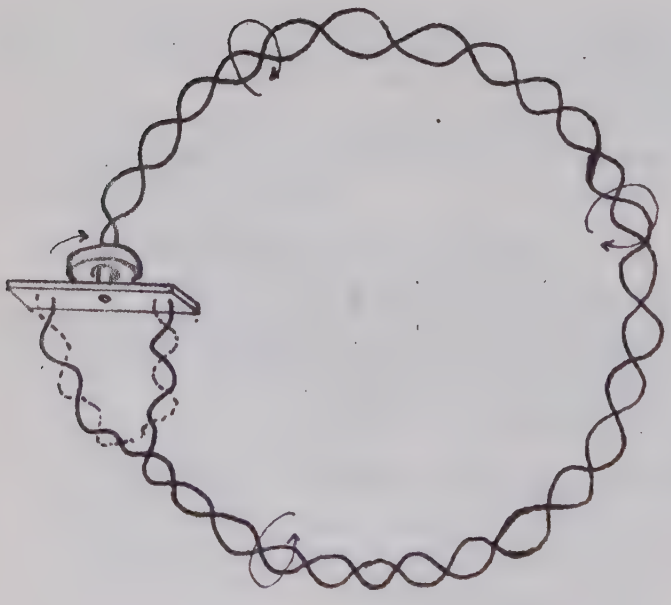
- Il n'est pas entouré d'une membrane,
- jamais le matériel génétique ne montre de signes d'organisation en chromosomes individualisés au microscope.

L'ensemble des déterminants génétiques sont répartis sur une structure unique, linéaire, ou mieux circulaire : 1 molécule de DNA qui est l'équivalent d'un unique chromosome sans en avoir la structure complexe, d'où le terme de génophore que certains lui réservent.

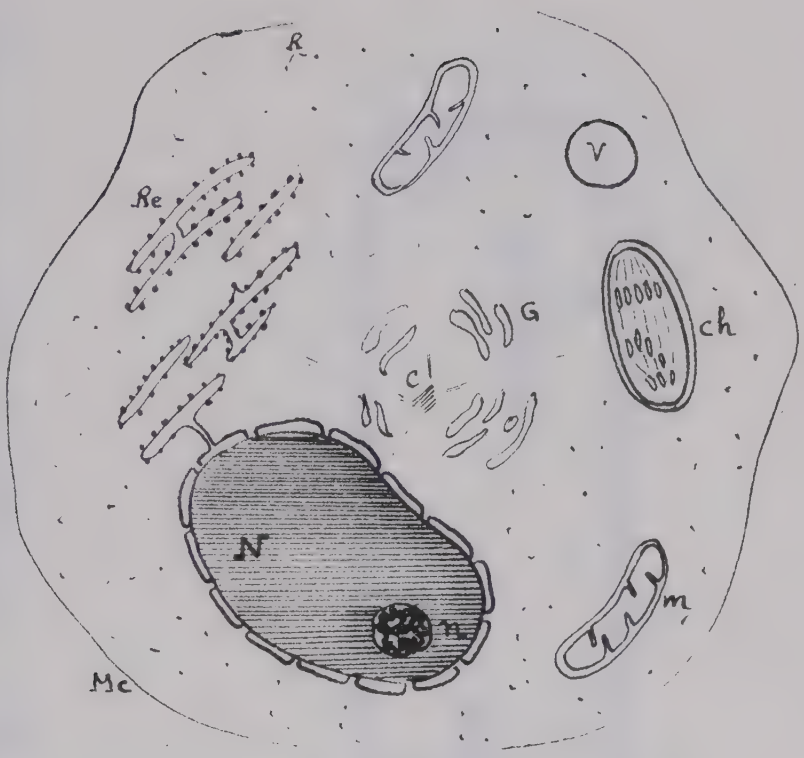
- on n'observe jamais de phénomène de mitose.



Replication d'une molécule de DNA

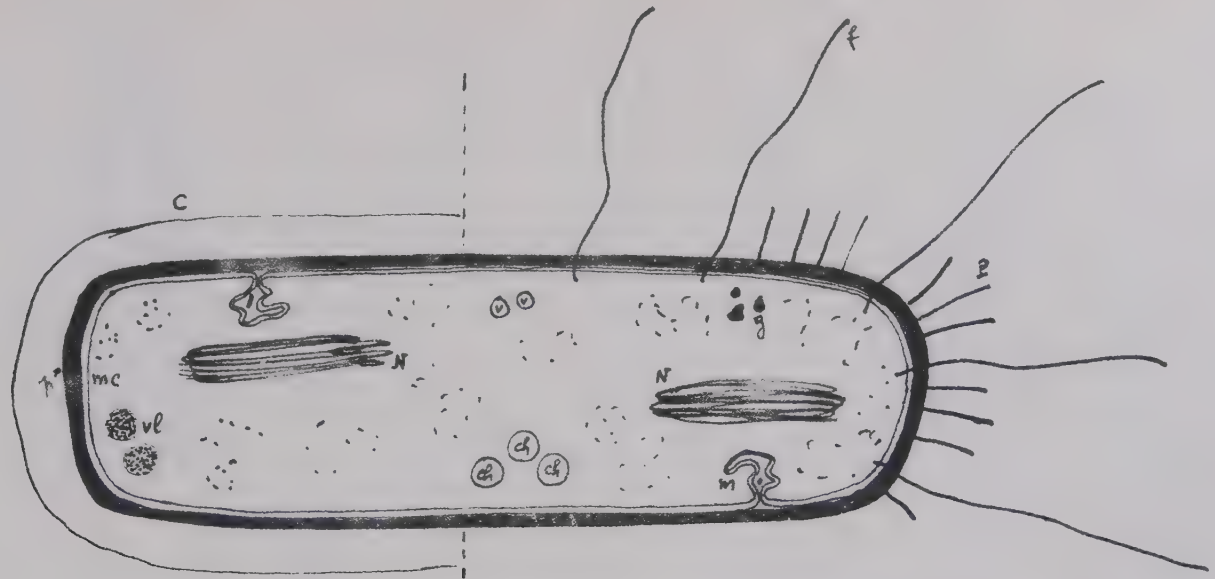


Mécanisme possible (d'après CAIRNS)



Schema de l'organisation d'une cellule eucaryote

Mc: membrane cytoplasmique ; N: noyau ; n: nucléole ;
m: mitochondrie ; Re: réticulum endoplasmique ; c: centrosome ;
G: golgi ; R: ribosomes (grains de Palade) ; ch: chloroplaste



N: noyau; m: mesosome; mc: membrane cytoplasmique; p: pilli; c: capsule
vl: vac. lipidique; v: volutine; g: glycogène
ch: chromatophore; f: flagelle; p: pili

Schéma d'une cellule bacterienne. (theorique)

DEUXIEME CHAPITRE

LE CYTOPLASME

I.- RAPPEL DE LA STRUCTURE DU CYTOPLASME D'UNE CELLULE EUCARYOTE

Le cytoplasme d'une cellule eucaryote présente une structure extrêmement complexe. (cf figure)

- AU CENTRE DE LA CELLULE : se trouve le centrosome dont la partie centrale contient 1 ou 2 centrioles.

  Des rayons semblent partir du centrosome, réalisant une figure astérienne (surtout au début de la mitose).

- DANS LE CYTOPLASME : se trouvent de nombreux organites et inclusions :
  - mitochondries
  - les sacs du réticulum endoplasmique avec les grains de Palade
  - l'appareil de Golgi
  - des vacuoles
  - chez les cellules végétales, des plastes.

1.- LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Le nom de réticulum endoplasmique a été donné à un réseau de canalicules et de vacuoles plus ou moins aplatis que l'on rencontre dans le cytoplasme de presque toutes les cellules, animales ou végétales.

Il est limité par une membrane d'environ 50 Å d'épaisseur. A l'intérieur de ces vacuoles aplaties, existe un liquide. A l'extérieur, se trouve le cytoplasme fondamental.

L'abondance et la disposition du réticulum endoplasmique varient beaucoup suivant les types cellulaires. Dans certaines cellules, il envahit tout le cytoplasme, laissant peu de place aux autres organites cellulaires.

Dans d'autres cellules, il est réduit à quelques éléments parfois difficiles à identifier. Tout ce réseau en général, communique et souvent s'ouvre dans l'espace périnucléaire. Il s'agit donc d'une sorte de réseau transformant le cytoplasme en une éponge, dont les cavités varient incessamment de forme et de taille.

Certaines vacuoles de ce réticulum présente sur leur face cytoplasmique des granulations arrondies de 50 à 200 Å de diamètre : les grains de Palade.

L'ensemble réticulum endoplasmique et grains de Palade constituent l' ERGASTOPLASME.

On trouve également des grains de Palade à l'intérieur du cytoplasme fondamental. Ces grains de Palade sont faits de RNA et de protéine ; ils jouent un grand rôle dans la synthèse protéique, ce sont les ribosomes.

2.- LES MITOCHONDRIES

Elles se rencontrent dans toute cellule eucaryote (animale - végétale - protiste eucaryote).

Ce sont des organites de quelques microns de diamètre, limités par une double membrane et subdivisés en plusieurs compartiments par des membranes transversales - les crêtes mitochondriales, qui prennent leur origine dans la lamelle interne de la double membrane d'enveloppe.

Les mitochondries contiennent :

- les enzymes du cycle tricarboxylique,
- les enzymes assurant le transfert des électrons à l'oxygène (cytochromes), système caractéristique de la respiration aérobie,
- le système, encore mal connu, qui permet la synthèse de l'ATP pendant le transfert des électrons.

Les enzymes qui assurent le transfert des électrons se trouvent spécifiquement sur les crêtes.

3.- LES PLASTES

Chez les cellules végétales, existent des PLASTES (leucoplastes et chromoplastes).

En particulier, dans les cellules eucaryotes photosynthétisantes (algues - plantes vertes), on trouve des chloroplastes.

Ce sont aussi des organites cellulaires fort complexes de 2 à 5μ, entourés d'une double membrane et contenant des structures lamellaires et des granulations.

- ces structures internes contiennent les pigments de la photosynthèse (chlorophylle et caraténoïdes) ainsi que les enzymes nécessaires à la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique.

- la structure externe contient les enzymes nécessaires à la conversion du CO_2 en glucides.

Ainsi, la fonction primaire des chloroplastes comme des mitochondries est la formation de liaisons chimiques à haut potentiel énergétique utilisables dans le métabolisme.

Dans le chloroplaste, la source d'énergie est fournie par la lumière, dans la mitochondrie par le substrat oxydable utilisé par la cellule.

Enfin, le cytoplasme des cellules eucaryotes est animé de mouvements :

- agitation des organites cellulaires ;
- mouvements de cyclose : c'est-à-dire courants cytoplasmiques.
- formation, mouvement et disparition des vacuoles.
- parfois mouvements amiboïdes.

Ces mouvements, du moins certains, sont dus à des transformations sol-gel du cytoplasme.

II.- STRUCTURE DU CYTOPLASME BACTERIEN

COMPARE A CELUI DES CELLULES EUCARYOTES, LE CYTOPLASME BACTERIEN MONTRE UNE STRUCTURE BEAUCOUP PLUS SIMPLE.

A.- LA MICROSCOPIE OPTIQUE

a.- La microscopie optique est de peu de secours pour son étude.

- elle ne montre guère qu'un aspect, soit homogène (cultures jeunes), soit granuleux (cultures âgées), et aussi la présence éventuelle d'inclusions sur lesquelles nous reviendrons;

- elle montre cependant un caractère important (différence avec les eucaryotes) l'absence de mouvements cytoplasmiques.
  Cette absence de mouvements cytoplasmiques chez les bactéries indique très certainement que le cytoplasme reste toujours à l'état de gel. Ce constant état de gel explique probablement que, malgré l'absence de membrane nucléaire, la différenciation cytoplasme-noyau soit maintenue.

Les mouvements des bactéries ne sont pas dus à des mouvements cytoplasmiques, mais à des flagelles ou à la contraction d'un filament axial.
Cependant, certaines bactéries (dont les Moraxelles) présentent des mouvements "de glissement", possibles seulement lorsque la cellule est en contact avec une paroi solide. Il consiste en une très lente progression qui ne s'accompagne d'aucun changement dans la forme de la cellule. On n'a pas pu mettre en évidence d'organes locomoteurs responsables de ce mouvement, dont le mécanisme est mysterieux.

B.- LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

En fait, la structure du cytoplasme bactérien nous est révélée par la microscopie électronique sur coupes ultra fines.

1.- LES CARACTERES LES PLUS FRAPPANTS SONT :

- sa très grande densité ;
- le petit nombre d'organites qu'il peut contenir ;
- l'absence de membranes internes, peut-être à mettre en parallèle avec l'absence de stérols.

2.- SUR LES COUPES ULTRAFINES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE LE CYTOPLASME BACTERIEN APPARAIT CONSTITUE ESSENTIELLEMENT de grains, de granules, d'un diamètre approximatif de 100 à 200 Å.

- on admet actuellement que ces granules sont les RIBOSOMES, c'est-à-dire le lieu des synthèses protéiques.

- il est possible d'obtenir les ribosomes sous forme purifiée par centrifugation à grande vitesse de broyats cellulaires.

- L'étude biochimique montre qu'ils sont constitués de protéine et de RNA en quantités à peu près égales

- par ultracentrifugation en gradient de saccharose, diverses fractions peuvent être séparées, ayant les constantes de sédimentation suivantes :

30 S - 50 S - 70 S

La proportion respective de ces différentes fractions varie avec la concentration en ions magnésium. (une faible concentration en Mg++ donne une dissociation), ce qui indique que les particules les plus lourdes sont formées par la réunion de plus petites.

La microscopie électronique en coloration négative de ribosomes isolés confirme ces résultats en montrant que les particules 70 S ne sont pas symétriques, mais sont formées par la fusion de particules de 30 et 50 S.

- En coupes minces, il n'est pas possible de distinguer ces différentes sortes de particules. Par contre, ce que l'on voit bien sur ces coupes, c'est que les ribosomes ne sont pas répartis uniformément dans le cytoplasme mais plutôt groupés en amas au sein d'une substance moins dense et homogène : les POLYRIBOSOMES.
Sur certaines images, on a l'impression de voir ces ribosomes réunis par un filament.

D'autres techniques permettent de mieux observer ces polyribosomes : traitement des cellules de façon à obtenir une lyse partielle de façon à diminuer la densité du cytoplasme.
Ces ribosomes sont le lieu des synthèses protéiques.

c.- LE CYTOPLASME BACTÉRIEN PEUT CONTENIR DES INCLUSIONS

Les bactéries peuvent dans certains cas accumuler dans leur cytoplasme des substances de réserves, soit sous forme finement dispersée, soit sous forme de granules distincts qui constituent des sortes de "vacuoles" non limitées par une membrane.

Ces substances de réserves sont de 3 types principaux :

- polymères organiques : réserves de carbone et d'énergie.
- polymères inorganiques de métaphosphate (volutine) : réserve de phosphate.
- soufre élémentaire : réserve d'énergie pour certaines bactéries.

1.- POLYMERES ORGANIQUES.

Les bactéries sont capables de stocker des réserves de carbone sous deux formes principales :

- lipidique : polymère d'acide β -hydroxybutyrique.
- glucidique : polymère de glucose proche du glycogène ou de l'amidon .

Les inclusions lipidiques de poly-acide β-hydroxybutyrique se présentent sous forme de granules suffisamment volumineux pour être visibles en microscopie optique.

Elles sont bien visibles en contraste de phase, et peuvent être identifiées par coloration par les colorants des graisses comme le Noir Soudan.

En microscopie électronique, elles se présentent sous forme de vacuoles assez grandes, paraissant vides (très faible opacité ou dissolution lors de la préparation).

Le glycogène et l'amidon sont habituellement accumulés sous forme de grains de beaucoup plus petites dimensions, visibles seulement au microscope électronique (très faible opacité).

En microscopie optique, on peut déceler leur présence dans la cellule, sinon leur individualisation, en traitant les cellules par les colorants des polysaccharides, en particulier par l'iode, qui, avec l'amidon, donne une couleur bleue, et avec le glycogène, une couleur brun acajou.

En général, une espèce bactérienne donnée ne constitue qu'un seul type de réserve,

les bacillus synthétisent l'acide poly-β-hydroxybutyrique.
les coliformes synthétisent le glycogène.

Il y a cependant deux exceptions :

les bactéries pourpres synthétisent les deux à la fois.

Dans les conditions de multiplication active, les bactéries ne synthétisent pas de grandes quantités de substances de réserve. Le carbone assimilé est immédiatement utilisé pour les synthèses.

Une accumulation massive de ces substances de réserve se produit lorsque les cellules manquent de source d'azote alors qu'elles ont carbone et énergie en quantité suffisante ; le manque d'azote limite les synthèses.
Dans ces conditions, la cellule peut stocker jusqu'à 50 % de son poids de matériel de réserve, qui sera utilisé lorsque la source d'azote sera à nouveau suffisante.

Il faut remarquer que l'accumulation sous forme de **polymères insolubles** correspond à une nécessité physiologique. En effet, si la bactérie accumulait jusqu'à 50 % de son poids de glucose, la pression osmotique interne serait telle que la cellule éclaterait. Dans le cas de l'acide β-hydroxy-butyrique, l'acidité serait très élevée.

En convertissant ces produits en polymères insolubles, la cellule les rend osmotiquement inactifs et la polymérisation de l'acide butyrique élimine son acidité, le radical COOH étant converti en liaison ester.

2.- POLYMERES INORGANIQUES DE METAPHOSPHATE : grains de volutine

Ces grains très réfringents, sont visibles en microscopie optique. Ce sont les granulations méta chromatiques.
En effet, en se combinant au bleu de toluidine ou d'autres bleus basiques, la volutine prend une couleur violet-rouge, phénomène appelé métachromasie (prise d'une teinte différente de la teinte fondamentale du colorant).
En microscopie électronique, apparaissent sous la forme de corps arrondis très opaques sans structure interne.

3.- SOUFRE ELEMENTAIRE -

Du soufre élémentaire s'accumule chez certaines bactéries sulfureuses sous la forme de grains sphériques et très réfringents.

Apparaissant ainsi à l'intérieur de la cellule, il est toujours un produit d'oxydation des sulfures et sa présence indique de façon certaine que l'on a affaire à une bactérie (sulfureuse) capable d'oxyder les sulfures.

Ces bactéries sont capables d'oxyder ensuite le soufre en sulfate et le soufre ne s'accumule que lorsque les sulfures sont abondants. Cependant, toutes les bactéries sulfureuses ne sont pas capables de stocker le soufre à l'intérieur de la cellule. Ceci est fonction de la taille de la cellule. Les petites déposent le soufre à l'extérieur.

D.- LES CHROMATOPHORES DES BACTÉRIES PHOTOSYNTHÉTISANTES

Chez les bactéries photosynthétisantes (par ex : Rhodospirullum rubrum) la chlorophylle est contenue dans de petites vésicules de 30 μ à 70 μ de diamètre environ, les chromatophores. Le cytoplasme peut en être bourré.

Ces chromatophores n'ont rien de comparable à la structure complexe d'un chloroplaste : ce sont de simples vésicules, limitées par une unique membrane.
Ils contiennent les pigments et les enzymes nécessaires à la fixation de l'énergie lumineuse en énergie chimique à haut potentiel, mais ils ne contiennent pas les enzymes nécessaires à la fixation du CO_2 qui se trouvent vraisemblablement dans le cytoplasme.
Ils ne sont donc pas l'homologue du chloroplaste, mais plutôt d'un des éléments du chloroplaste : le granum.

Ces vésicules dérivent vraisemblablement de la membrane cytoplasmique. D'après BOATMAN et DOUGLAS, elles prennent naissance à partir de cette membrane comme des vésicules qui sont probablement libérées dans le cytoplasme par un processus de pincement lorsqu'elles sont matures.

III.- EN CONCLUSION

Le cytoplasme bactérien présente une structure beaucoup plus simple que celui de la cellule eucaryote.

- pas de mouvements de cyclose,

- pas d'organites différenciés :

  - de centrosomes
  - de réticulum endoplasmique
  - d'appareil de Golgi
  - de plastes
  - de chondriome

Les processus énergétiques, respiratoires s'y produisent pourtant. Leur siège est la membrane cytoplasmique et surtout les mésosomes, dépendance de cette membrane que nous étudions dans le chapitre suivant.

LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

Directement appliquée à la surface du cytoplasme qu'elle sépare de la paroi, se trouve la membrane cytoplasmique.

I.- MISE EN EVIDENCE

- LES PREMIERES PREUVES DE L'EXISTENCE CHEZ LES BACTERIES

d'une membrane cytoplasmique comparable à celle des cellules animales ou végétales, et distincte de la paroi, ont été apportées par des expériences de plasmolyse.

On a pu observer que, lorsque les bactéries sont placées dans une solution fortement hypertonique, le cytoplasme bactérien se décolle de la paroi et apparait entouré d'une membrane plus réfringente, dont on peut d'ailleurs augmenter le contraste par coloration.

Le fait que cette rétraction se produit montre qu'il existe, distincte de la paroi, une membrane douée de perméabilité sélective.

- CETTE MEMBRANE SE COLORE TRES BIEN

Elle fixe intensément les colorants, et c'est elle que l'on colore essentiellement par les colorations usuelles.

- ON EST PARVENU A SEPARER LA MEMBRANE DES AUTRES CONSTITUANTS CELLULAIRES :

Chez les bactéries gram positives, on "dissout" la paroi par action du lysozyme en milieu hypertonique ; on obtient alors une cellule bactérienne dépourvue de paroi : un protoplaste.

Ces protoplastes sont lavés dans une solution hypertonique et ensuite lysés par mise en suspension dans l'eau distillée. On recueille ensuite les membranes par centrifugation : elles apparaissent comme des vésicules vides.

- ENFIN, CETTE MEMBRANE EST VISIBLE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Elle est mince : de 50 à 100 Å

Sur les premières photographies, elle était apparue constituée d'une seule couche homogène.

En fait, sur les clichés plus récents, on la voit le plus souvent, formée de trois couches : une couche claire, peu dense, entre deux couches opaques.

Ceci suggère une structure comparable à celle des cellules eucaryotes (couche lipidique entre 2 couches protéiques).

II.- L'ANALYSE CHIMIQUE DE MEMBRANES CYTOPLASMIQUES

Elle montre qu'elle est effectivement constituée surtout de protéines et de lipides et qu'elle a une composition entièrement différente de la paroi qui l'entoure.

Elle a donc une composition proche de celle de toutes les membranes cellulaires. Il faut noter toutefois quelques différences portant surtout sur les constituants lipidiques et, en particulier : l'absence probable de Stérols (sauf chez les mycoplasmes).

III.- LES MESOSOMES

On a mis en évidence assez récemment sur des coupes fines en microscopie électronique et tout d'abord chez des bactéries Gram positives, des Bacillus notamment, des formations lamellaires ou tubulaires intracytoplasmiques, qui semblent n'être que des invaginations plus ou moins complexes de la membrane cytoplasmique.

. Chez les bactéries Gram positives, et notamment chez les Bacillus, ces formations sont souvent très développées, formant un véritable organite cellulaire intracytoplasmique.

Les images observées sont différentes selon le plan de la coupe :

Parfois, elles donnent l'impression de lamelles approximativement concentriques, parfois de petites vésicules ou tubules.

La membrane qui sépare ces organites du cytoplasme et les membranes des vésicules ou tubules internes ont le même aspect et la même épaisseur que la membrane cytoplasmique.

Ces formations paraissent donc bien constituées par des invaginations de la membrane cytoplasmique.

On les appelle MESOSOMES - (FITZ - JAMES) ou parfois Plasmalemmosomes.

Ces mésosomes sont situés préférentiellement :

- soit dans le voisinage du noyau,
- soit aux pôles de la bactérie,
- ou parfois près de l'étranglement de la division cellulaire.

. Chez les bactéries Gram négatives, on n'observe pas de mésosomes aussi développés que chez les bactéries Gram positives.

Cependant, avec le perfectionnement des techniques, on a pu mettre en évidence chez plusieurs d'entre elles, et notamment chez E. coli, des structures membranaires peu développées (excepté chez un mutant où leurs dimensions atteignent presque celles des mésosomes de B. subtilis). Ce sont de simples replis de la membrane, peu développés, sans formations tubulaires . Leurs faibles dimensions expliquent leur difficulté de mise en évidence : il faut que le plan de la coupe passe exactement par eux.

Ils sont localisés, comme les mésosomes de B. subtilis, aux deux pôles, au tiers central de la bactérie et au voisinage du noyau.

Ils sont très certainement l'homologue des mésosomes des bactéries gram positives.

IV.- LE ROLE DE LA MEMBRANE CYTOPLASMATIQUE EST CONSIDERABLE

1.- ELLE A UN ROLE DE PERMEABILITE SELECTIVE -

- pour les diverses substances qui doivent pénétrer dans la cellule.
  - à son niveau, se trouvent très certainement les perméases qui commandent ces entrées dans la cellule.
  - elle a de même un rôle de barrière osmotique, comme le montrent les expériences de plasmolyse.
- mais, aussi; pour les "sorties" : excrétion spécifique de polysaccharides, de polypeptides, protéines (enzymes, exotoxines...)

2.- ELLE EST LE SIEGE DE NOMBREUX AUTRES ENZYMES,

et notamment des enzymes du métabolisme respiratoire : cytochromes et enzymes du cycle tricarboxylique.

Ainsi, la membrane cytoplasmique des bactéries a les fonctions métaboliques que possèdent les crêtes mitochondriales chez les eucaryotes.

Il n'est pas certain cependant que les enzymes respiratoires soient répartis uniformément sur la totalité de la membrane : ils semblent plutôt concentrés au niveau des mésosomes et de la partie de la membrane adjacente à ces mésosomes (le reste de la membrane en contiendrait une plus faible quantité.)

C'est ce que semblent bien démontrer les techniques de cytochimie associée à la microscopie électronique.

Les bactéries sont cultivées dans un milieu contenant du tellurite de potassium ou un sel de tetrazolium, colorant usuel des mitochondries.
Après un certain temps d'incubation, elles sont prélevées et préparées pour la microscopie électronique.

Le formazan, produit de réduction des sels de tetrazolium ou le précipité de tellurite, réduit, est opaque aux électrons. Parmi ces conditions, la présence de ce corps est décelé au niveau de la membrane et surtout des mésosomes.

Ces constatations réconcilient deux opinions divergentes sur la localisation des enzymes respiratoires chez les bactéries à savoir :

- une première hypothèse, soutenue surtout par les biochimistes, considèrant que les enzymes respiratoires avaient pour siège principal la membrane.

  Cette hypothèse était basée sur le fait que des fractions cellulaires ne contenant apparemment que la membrane cytoplasmique donnaient les réactions biochimiques propres au cycle respiratoire.

- une deuxième hypothèse, à l'opposé, les cytologistes bactériens défendaient l'opinion de sites d'oxydoré - duction individualisés intracytoplasmiques, en se basant sur des observations faites en microscopie optique, utilisant les colorants usuels des mitochondries, en particulier la réduction des sels de tetrazolium (formazan rouge), ou encore d'autres techniques microscopiques.

Il n'y a plus de contradiction fondamentale entre ces deux opinions puisqu'il parait certain que les mésosomes sont bien des dépendances de la membrane cytoplasmique.

AU TOTAL : La membrane cytoplasmique et surtout les mésosomes qui en dépendent possèdent donc les propriétés dévolues aux mitochondries.

3.- ROLE DE LA MEMBRANE ET DES MESOSOMES DANS LA DIVISION NUCLEAIRE

(travaux de JACOB et RYTER).

Les études de génétique bactérienne et notamment de la conjugaison chez E. coli ont conduit JACOB à penser que les éléments génétiques de la bactérie, chromosome et épisomes, devaient être attachés à la membrane cellulaire : ce serait au niveau de ce point d'attache que se ferait la coordination entre la réplication de l'ADN et la division cellulaire, ainsi que la séparation des deux chromosomes frères. (fig.1).

figure 1 (RYTER)

Si le chromosome bactérien, représenté par une boucle, est attaché à la membrane cellulaire, la synthèse de celle-ci localisée dans le plan du point d'attache repousserait les chromosomes qui viennent de se répliquer et assurerait ainsi leur séparation.

HYPOTHÈSE DE JACOB ET RYTER

Il fallait d'abord démontrer l'existence d'une liaison réelle et constante entre noyau et membrane.

1.- CHEZ LES B. SUBTILIS :

JACOB et RYTER font des coupes en série de B. subtilis qu'ils examinent au microscope électronique, et réalisent ensuite des reconstitutions tridimensionnelles.

De cette façon, ils ont réussi à démontrer, chez B. subtilis :

a.- que la mésosome est toujours bien en contact avec la membrane cytoplasmique dont il est une dépendance.

b.- que les noyaux bactériens sont toujours en contact avec 1 ou 2 mésosomes.

les petits noyaux avec 1 mésosome
les gros noyaux avec 2 mésosomes.

c.- Ces images d'association entre mésosome et noyau semblent bien correspondre à une véritable liaison.

En effet, au cours d'expériences de plasmolyse, on voit que le mésosome est "expulsé" de la cellule (fig. 2).

figure 2 (RYTER)

Au cours de ces expériences, le mésosome progressivement expulsé semble tirer le noyau avec lui, ce qui aboutit à des images d'attachement direct du noyau à la membrane.

Statistiquement, ces images ne sont pas des artéfacts mais sont des structures réelles.

Donc, chez B. subtilis, le noyau bactérien est bien toujours lié, par l'intermédiaire des mésosomes à la membrane cytoplasmique.

2.- CHEZ LES BACTERIES GRAM NEGATIVES

nous l'avons vu, il n'existe pas de structures absolument identiques aux mésosomes, mais tout porte à croire que les discrètes structures membranaires visibles sur certaines coupes en sont l'équivalent.

Etant donné leur faible développement, il n'était pas possible, par des reconstitutions tridimensionnelles, de prouver leur liaison au noyau.

De plus, lors des expériences de plasmolyse, ils ne sont pas expulsés du cytoplasme comme les mésosomes, mais paraissent se dérouler progressivement.

JACOB et RYTER ont utilisé un raisonnement un peu différent, basé cependant sur l'analyse statistique des images obtenues sur coupes (1966).

Ils en déduisent que chez E. coli, comme chez B. subtilis, le noyau est lié à la membrane cytoplasmique, et qu'il n'existe très probablement qu'un seul point d'attache.

Ainsi, cette liaison noyau-membrane semble être un phénomène très général chez les bactéries, et il est très probable qu'elle rend compte du mécanisme intime de la division nucléaire et de la séparation des 2 chromosomes fils après réplication du chromosome initial (fig. 3)

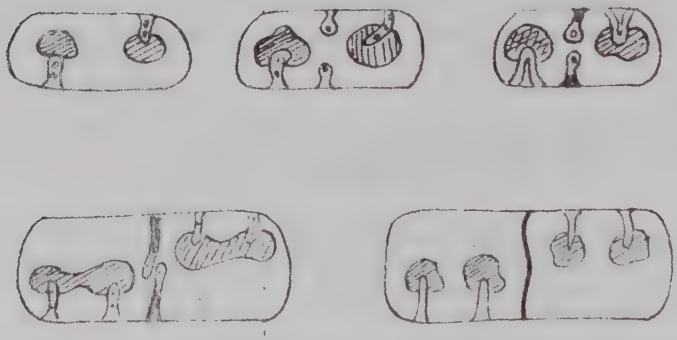


figure 3 (RYTER

Le cycle serait le suivant

- au début du cycle, les 2 noyaux de la bactérie sont liés chacun à un mésosome.
- parallèlement à la duplication du chromosome, qui se manifeste par une augmentation de volume du noyau, les mésosomes grossissent et le septum de division apparait.
- puis, les images semblent indiquer que les mésosomes se scindent en 2 mésosomes-frères.

- Les 2 mésosomes-frères s'écartent alors progressivement l'un de l'autre, tandis que les noyaux se séparent et que le septum de division se termine.

L'écartement des 2 mésosomes est très certainement la conséquence de la croissance de la membrane entre chacun d'eux.

C'est donc la croissance de la membrane située au niveau du mésosome initial puis, entre les 2 mésosomes qui permettrait la séparation des noyaux.

Cette croissance localisée de la membrane a d'ailleurs été prouvée par JACOB et RYTER :

- en cultivant des bactéries en présence de tellurite de potassium.

Des cristaux de tellure se déposent le long de la membrane, et on peut les voir au microscope électronique comme nous l'avons vu plus haut.

Si le temps de culture dans un tel milieu est limité, on pourra reconnaitre les zones de membranes existant pendant ce temps. Puis, si on change le milieu, la membrane nouvellement synthétisée ne présentera pas de dépôts de tellure (fig. 4).

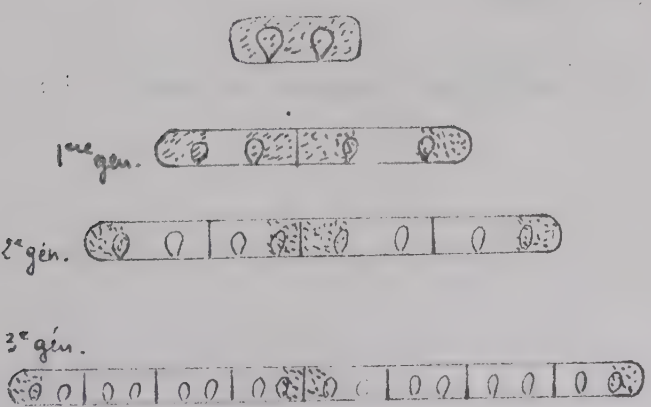


figure 4 (RYTER)

Ainsi : Membrane bactérienne et mésosomes semblent bien jouer un rôle très important dans la division nucléaire.

Ce mécanisme que l'on vient de décrire et qui maintient presque constamment la présence de 2 noyaux par bactérie semble bien représenter le mécanisme habituel intervenant au cours de la croissance, car les bactéries sont dans leur majorité binucléées.

Il suggère le fait que la membrane bactérienne joue en quelque sorte de ce point de vue le rôle du chromosome des cellules eucaryotes (JACOB).

En effet, un chromosome, ce n'est pas seulement du DNA, mais aussi un support pour ce DNA, une unité de ségrégation.

4.- LES MESOSOMES JOUENT PROBABLEMENT AUSSI UN ROLE DANS LA FORMATION DU SEPTUM (et peut-être même dans la synthèse de la paroi en général).
Car il existe toujours des mésosomes au voisinage d'un septum en formation.

Mais ces mésosomes semblent avoir une existence transitoire, puisque, une fois achevés, le septum en est dépourvu.

Leur présence est peut-être seulement la traduction d'un besoin local important en énergie.

5.- ON LES RETROUVE, de MEME, AU MOMENT DE LA SPORULATION .

E N R E S U M E :

Soulignons l'importance capitale de la membrane cytoplasmique et des mésosomes ou de leurs équivalents.

. Outre la fonction de perméabilité sélective,

. Le rôle dans le métabolisme respiratoire,

. Le rôle dans la division nucléaire et probablement dans la division cellulaire (septum - paroi).

Tout en étant l'homologue des mitochondries, elle possède certaines propriétés des chromosomes.

TROISIEME CHAPITRE

LA PAROI

La paroi bactérienne (CELL-WALL) est une structure de protection, dont la fonction essentielle est de s'opposer au gonflement et à la lyse osmotique du protoplasme de la cellule, par entrée d'eau, qui ne manqueraient pas de se produire, puisque le contenu bactérien possède une pression osmotique supérieure à celle du milieu ambiant.

A part quelques exceptions, sur lesquelles nous reviendrons, toutes les bactéries la possèdent. Mais elle n'est pas en elle-même un caractère propre aux bactéries, puisque l'on rencontre une formation semblable chez de nombreux protistes supérieurs et chez les plantes. Cependant, la paroi des bactéries a son originalité : elle réside dans la nature chimique du composé macromoléculaire responsable de la rigidité.

I.- MISE EN EVIDENCE

La présence d'une telle paroi chez les bactéries a été déduite tout d'abord, par les premiers bactériologistes, de la rigidité de ces organismes et de leur résistance à la dissolution par les acides et les bases.

En effet, le faible indice de réfraction de la paroi bactérienne la rend difficile, voire impossible à observer en microscopie optique. De plus, cette structure a seulement une légère affinité pour les colorants, de sorte que les premiers chercheurs n'ont pu démontrer sa présence avec les techniques de coloration dont ils disposaient.

La première démonstration directe de l'existence de la paroi fut réalisée par les expériences de plasmolyse que nous avons décrites pour la membrane : expériences durant lesquelles, le contenu cytoplasmique de la bactérie se rétracte, en se détachant de la couche interne de la paroi, qui, elle, ne se collabe pas. On obtient ainsi une sorte de fantôme cellulaire légèrement dessiné et partiellement rempli par le cytoplasme rétracté et plus réfringent.

La mise en évidence directe de la paroi a, depuis, été réalisée par de nombreux autres moyens

- microdissection,
- réaction avec des anticorps spécifiques,
- destruction de cette paroi, ce qui aboutit à l'obtention de bactéries particulières : les protoplastes
- séparation et isolement par rupture mécanique des bactéries.

- différents procédés de coloration
- microscopie électronique.

Détaillons quelques-unes de ces méthodes.

I.- PROCÉDÉS DE COLORATION

La paroi est difficile à colorer, et plus encore pour les bactéries gram négatives que pour les bactéries positives.

- Les colorations simples par les colorants basiques dérivés du triphénylméthane (c'est-à-dire fuchsine, cristal violet, violet de gentiane) ne colorent pratiquement pas les parois des gram négatives, alors qu'à des pH alcalins, ils colorent en général les parois des gram positives.

- On peut colorer les parois, après fixation des préparations par l'acide osmique, par le vert Janus ou le bleu Alcian, sans mordançage préalable (bien que le temps nécessaire à la coloration varie beaucoup d'une espèce à l'autre et que l'intensité de la coloration puisse laisser beaucoup à désirer).

- La plupart des méthodes publiées utilisent des mordants, par exemple :

  - tanin, suivi d'une coloration par un colorant basique dérivé du triphénylméthane,
  - acide phosphomolybdique, puis vert de méthyle
  - chlorure de cétyl-pyridinium, puis rouge Congo.

- Pour les gram négatives, une bonne méthode de coloration utilise le rouge Congo, après un temps préalable d'action d'un colorant basique du triphénylméthane, fuchsine ou cristal violet.

- L'oxydation avec le périodate ou l'acide périodique suivie d'un temps d'action du réactif de Schiff, comme dans les techniques de PENNINGTON ou de HOTCHKISS - Mac MANUS, permet de colorer les parois de la plupart des bactéries. Ce comportement indique la présence de polysaccharide avec le groupement caractéristique - CHOH - CHOH.

- Quant à la coloration de Gram, elle ne colore pas la paroi elle-même, mais il est évident qu'elle est en relation avec une différence de structure entre les parois des bactéries gram positives et négatives, mais, son mécanisme intime a donné lieu à de nombreuses hypothèses successives, qui se ramènent à deux types :

  - mécanisme chimique basé sur la possession d'une substance particulière ou d'un groupe de substances propres au Gram positif, qui fournirait un complexe solide avec le violet de gentiane et le lugol, complexe indissociable par l'alcool.

  - les autres invoquent une différence de perméabilité de la paroi entre gram positive et gram négative. La plus grande perméabilité chez les gram négatives permettrait à l'alcool-acétone d'entrainer facilement le colorant préalablement fixé. C'est cette dernière hypothèse qui semble actuellement prévaloir.

2.- PROCÉDÉS D'ISOLEMENT

De nombreux procédés permettent de rompre les cellules bactériennes et d'obtenir les parois à l'état séparé.

a.- L'AUTOLYSE :

On laisse les bactéries s'autolyser sous l'action du toluène pendant plusieurs jours, puis on les soumet à une digestion trypsique

Ce procédé a comme inconvénient :

- d'une part, de laisser subsister souvent des fragments cytoplasmiques.
- d'autre part, de permettre une dégradation enzymatique simultanée de la paroi elle-même.

b.- RUPTURE DES BACTERIES PAR CHAUFFAGE -

Les parois des espèces gram négatives, au contraire de celles à gram positive, sont rompues si on projette un petit volume de suspension bactérienne dans un grand volume d'eau portée à 80/100°.

On fait subir alternativement aux bactéries des traitements à 55/100° et à 0°, suivie d'une centrifugation différentielle.

Le rendement de la méthode est faible. Une altération simultanée des parois est probable.

c.- RUPTURE DES BACTERIES PAR CONGELATION ET DECONGELATION SUCCESSIVES -

Si on alterne des congèlations à basse température suivies de brusques décongélations, les parois de nombreuses bactéries subissent une rupture progressive qui s'accompagne d'une diffusion des constituants cellulaires.

d.- BROYAGE MECANIQUE DES BACTERIES -

Divers appareils permettent de broyer mécaniquement les bactéries en présence le plus souvent de sable, de perles de verre ou de métal.

e.- DESTRUCTION DES BACTERIES PAR ULTRASONS -

f.- DESTRUCTION DU PROTOPLASME PAR ACTION ENZYMATIQUE

par la trypsine notamment.

Les bactéries vivantes, comme toute cellule vivante, résistent à l'action de la trypsine.

Mais si les bactéries sont au préalable tuées par la chaleur, la trypsine alors détruit le cytoplasme et l'on obtient des parois vides que l'on peut alors étudier .

3.- ASPECT EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

L'aspect des parois peut être étudié de deux façons ; soit par ombrage ou coloration négative de parois isolées, soit sur coupes ultrafines de bactéries.

a.- LES PAROIS ISOLEES

observées après ombrage ou coloration négative, apparaissent comme des sacs ayant grossièrement la forme de la bactérie, mais, en général, aplatis par le traitement qu'elles ont subi pour l'observation en microscopie électronique. Sur les premières préparations obtenues, les parois apparaissaient homogènes et de structure amorphe.

Des travaux récents montrent que chez certaines espèces, tout au moins, la paroi présente une structure définie. C'est ainsi que chez des Spirilles (Sp. serpens, Rhodospirullum rubrum), la paroi parait constituée de subunités visibles à structure polygonale d'un diamètre de 80 à 100 A, donnant un aspect en mosaïque. De même chez Bacillus polymyxa, un travail récent de NERMUT et MURRAY montre à la surface de la paroi, la présence de subinités globulaires de 70 A de diamètre régulièrement réparties de telle sorte que les centres de ces subunités sont distants de 100 A. Chez d'autres bactéries, une telle structure n'est pas visible, mais la paroi semble avoir une texture "fibreuse" (B. megaterium).

b.- EN COUPES

Il faut opposer la paroi des bactéries gram positives à celle des bactéries gram négatives.
La paroi des bactéries gram positives apparait le plus souvent comme une couche unique, d'opacité homogène, de 150 à 300 A d'épaisseur.

Toutefois, les travaux récents montrent que cette paroi des bactéries gram positives peut, avoir, au moins dans certains cas, une structure plus complexe. C'est ainsi que NERMUT et MURRAY décrivent dans la paroi de B. polymyxa trois couches.

La paroi des bactéries gram négatives, bien qu'unpeu plus mince, apparait constamment de structure plus complexe. On y observe une structure faite de trois couches (une couche claire entre deux couches opaques). Cet ensemble est séparé de la membrane cytoplasmique sous jacente par un espace "vide" sur les préparations classiques, coloré seulement par traitement des coupes par le nitrate de lanthane ou l'acétate d'uranyle (MURRAY et DE PETRIS). Chez la plupart des bactéries gram négatives, les trois feuillets superficiels sont étroitement liés à ce feuillet profond.

Par contre, chez certaines autres bactéries (Moraxella - Vitreoscilla - Spirilles), ils lui sont liés de façon beaucoup plus lâche formant des replis (fig. 1).

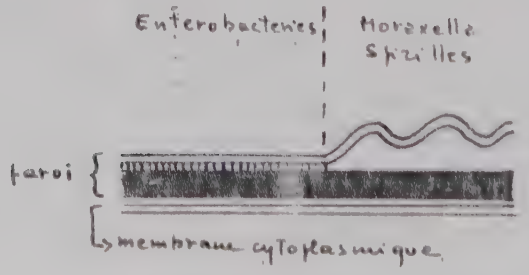


figure 1 (ELLIOT)

II.- PROPRIETES PHYSIQUES

1.- LA PAROI REPRESENTE UNE FRACTION IMPORTANTE DU MATERIEL CELLULAIRE TOTAL :

20 à 35 % du poids sec de la bactérie.

2.- ELLE EST RIGIDE, DUCTILE ET ELASTIQUE

- RIGIDE : c'est-à-dire qu'elle conserve sa forme
  - au cours des expériences de plasmolyse, on l'a vu plus haut ;
  - en milieu aqueux, les bactéries ne prennent pas une forme sphérique, forme que devraient prendre des objets aussi petits que des bactéries, soumis aux forces de surface, s'ils n'étaient pas rigides.

Une intéressante démonstration de la rigidité est donnée par des expériences d'ultracentrifugation de Spirillum volutans à 400 000 g, au cours desquelles la forme spiralée de la bactérie n'est pas altérée.

Cette rigidité varie d'ailleurs d'une espèce à l'autre, comme le montrent les différences de facilité avec lesquelles on peut rompre des bactéries par différents moyens, dont les ultrasons.

- DUCTILE :

On peut l'étirer, l'amincir sans la rompre.

Cette propriété des parois a été très bien démontrée pour Mycobacterium tuberculosis avec des préparations séchées sur membrane de collodion. La tension de la membrane de collodion étire les parois bacillaires, qui lui adhèrent sans provoquer leur rupture.

- ELASTIQUE -

Après avoir été étirée, elle reprend sa forme initiale.

Ceci a pu être démontré en particulier par des expériences de microdissection (WAMOCHSER). On note la réponse élastique de la paroi sous la manipulation par les micro-aiguilles.

III.- CONSTITUTION CHIMIQUE

La constitution chimique de la paroi bactérienne est complexe et variable selon les espèces.

Il existe en particulier des différences importantes entre bactéries gram positives et bactéries gram négatives, comme le montre de façon grossière l'étude des produits d'hydrolyse acide de cette paroi.

- CHEZ LES GRAM POSITIVES :

On obtient de cette façon un nombre assez limité de constituants.

Deux sucres aminés { acétyl-glucosamine ; acide acétyl-muramique

Quelques amino-acides { L et D-alanine ; L-lysine ou D.A.P.(ac. diaminopimélique) ; acide D-glutamique ; glycine

et quelques autres produits.

- CHEZ LES GRAM NEGATIVES

Beaucoup d'autres constituants sont retrouvés à côté des éléments précédents :

- amino-acides et sucres variés
- lipides (absents de la paroi des gram positives).

A.- L A M U R E I N E

Un élément fondamental est commun à toutes les bactéries (à l'exception des mycoplasmes et de quelques formes bactériennes particulières), c'est le constituant macromoléculaire responsable de la rigidité de cette paroi, la muréine encore appelée mucocomplexe, mucopeptide, glucosaminopeptide, peptido glycane.

Cette étude de la constitution chimique de la paroi bactérienne comportera donc deux parties :

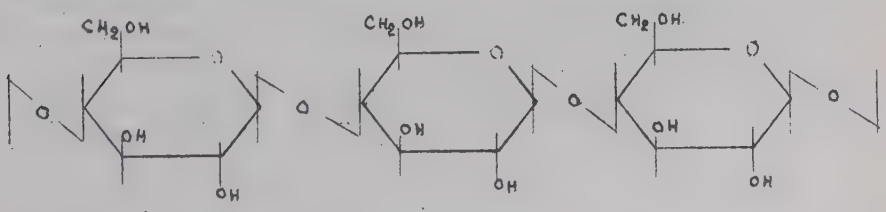
- celle de la muréine,
- celle des autres constituants.

La muréine est, selon les opinions actuelles, une énorme macromolécule en forme de sac qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité.

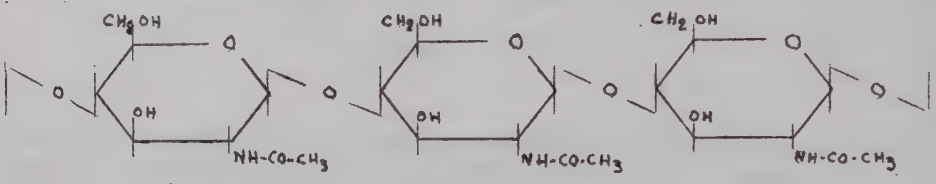
La nature chimique de ce mucocomplexe est propre aux bactéries : il se trouve uniquement dans le monde bactérien.

Il est différent, quoique appartenant à la même catégorie de corps, des constituants macromoléculaires responsables de la rigidité des parois des végétaux ou des protistes supérieurs.

Chez les plantes et les algues vertes, le composé responsable de cette rigidité est la cellulose, polymère à longue chaine de glucose.



Chez la plupart des champignons, c'est la chitine ; long polymère d'un sucre aminé, l'acétyl-glucosamine. La chitine est également l'élément constitutif de l'exosquelette des insectes et des crustacés.



Le mucocomplexe des bactéries est proche de la chitine mais en diffère en particulier par le fait qu'aux polysaccharides sont associés des acides aminés (d'où les termes de mucocomplexe, mucopeptide ...). Ceci est propre aux bactéries ; la chitine et la cellulose sont seulement des polysaccharides.

Il est remarquable aussi que dans ce mucocomplexe bactérien se retrouve seulement un petit nombre d'acides aminés parmi les vingt acides aminés présents dans les protéines :

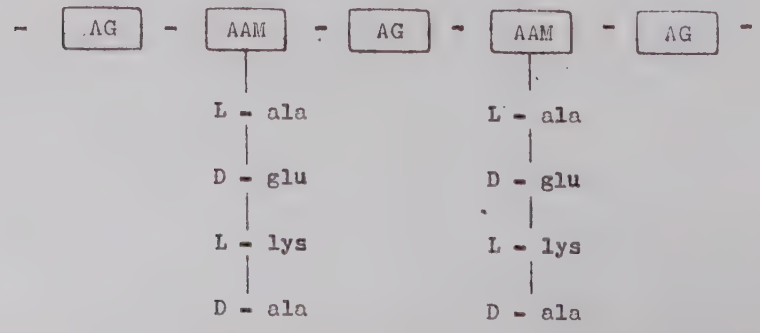
- l'acide glutamique,
- l'alamine,
- la lysine ou l'acide diaminopimélique,
- le glycocolle.

De plus, plus rarement, quelques autres acides aminés se trouvent en grande partie sous leur forme D alors que dans les autres cellules, les acides aminés sont habituellement présents sous forme L.

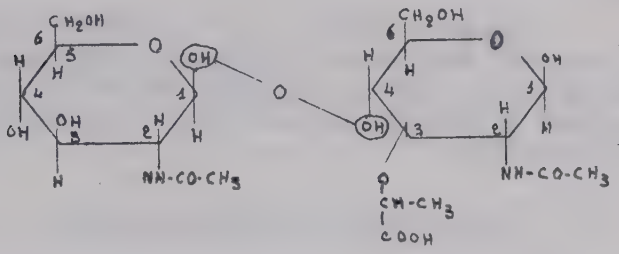
1.- LA MUREINE du STAPHYLOCOQUE

Envisageons comme type de description la muréine du Staphylococcus aureus qui a été la première et la plus étudiée.

a.- La structure de base de cette muréine est une chaîne polysaccharide sur laquelle sont branchés des tétrapeptides.



Cette chaîne polysaccharide est faite de l'alternance régulière de deux sucres aminés : la N. acétyl glucosamine et l'acide N. acétyl muramique. Ce dernier diffère de l'acétyl-glucosamine par la fixation sur le carbone 3 d'un radical lactyl ; il paraît propre au monde bactérien . Ces deux sucres sont liés entre eux par des liaisons osidiques β 1 - 4 .



Cette chaîne est donc proche de la chitine dont elle diffère par la fixation d'un radical lactyl sur une molécule sur deux d'acétyl-glucosamine.
Sur chaque molécule d'acide acétyl muramique de cette chaîne est fixé un tétrapeptide lié au - COOH - du radical lactyl. Ce tétrapeptide a la séquence suivante :

L - alanine, acide D glutamique (lié à la L - alanine par son - COOH en γ), L lysine, D alanine.

b.- La muréine complète représente une sorte de réseau formé par la réunion d'un certain nombre de ces structures de base. Elles sont liées entre elles par l'intermédiaire de ponts interpeptidiques tendus d'un tétrapeptide d'une chaîne à un tetrapeptide d'une autre chaîne. Ces ponts sont constitués d'un peptide fait de cinq molécules de glycocolle, lié d'une part au groupe ε aminé de la lysine, d'autre part, au groupe - COOH terminal de la D alanine d'un autre tétrapeptide.

Ces liaisons aboutissent ainsi à la formation d'un réseau à deux ou trois dimensions, ce sont elles qui confèrent à l'ensemble sa rigidité.

2.- LES MUREINES DES DIVERSES ESPECES BACTERIENNES

Elles peuvent légèrement différer de celle de Staphylococcus aureus.

Elles ont toujours comme structure commune des chaines polysaccharidiques linéaires où alternent l'acétyl glucosamine et l'acide acétyl muramique et sur lesquelles s'attache un tétrapeptide au carboxyle de chaque acide acétyl - muramique.

Mais des variations sont possibles :

- très minimes en ce qui concerne la chaine polysaccharidique.

- limitées au niveau du tétrapeptide ;

  - l'acide glutamique peut être substitué sur son - COOH en
    exemple : le radical NH_2 chez staphylococque doré
    le glycocolle chez Mic lysodeiktieus.

  - surtout la L. lysine peut être remplacée assez souvent par un autre acide aminé dibasique avant tout l'acide diaminopimélique, comme c'est le cas chez les bactéries gram négatives, les bacillus et diverses espèces du genre corynebactérium, plus rarement d'autres : l'hydroxylysine, la L. ornithine...

- mais aussi au niveau du pont qui unit les chaines : diglycine, mono di ou tri alanine, tri L alanyl - L. thréonine ou plus complexes.

Dans les parois à DAP, la liaison est faite directement entre la D-alanine d'un tétrapeptide et le DAP d'un autre tétrapeptide. Ceci est très vraisemblable chez E. coli, démontré chez C. diphteriae.

B.- LES AUTRES CONSTITUANTS DE LA PAROI

La mucopeptide ne représente pas l'unique constituant de la paroi bactérienne, et il y a de ce point de vue de grandes différences entre les bactéries gram positives et les bactéries gram négatives.

1.- CHEZ LES GRAM POSITIFS

Le mucopeptide représente la plus grande partie de la paroi (80 à 90 % chez certains - 50 à 60 % chez d'autres).

D'autres constituants lui sont cependant associés.

a.- CHEZ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

On trouve des acides TEICHOIQUES

(polymères d'un ester phosphorique d'un sucre-alcool, le ribitol ou le glycérol - associés éventuellement à d'autres constituants).

Pour staphylococcus aureus, le sucre-alcool est le ribitol :

- Ribitol-P-Ribitol-P-Ribitol-

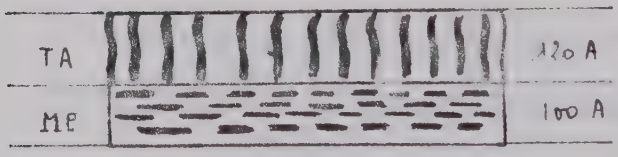
sur lequel seraient attachés des résidus acétylglucosamine et alanine.

Le lieu de fixation exact de ces acides teichoïques n'est pas bien connu : certains les situent en surface - liés à AG. D'autres, les figurent liés à l'alanine.

b.- CHEZ LES AUTRES BACTERIES GRAM POSITIVES

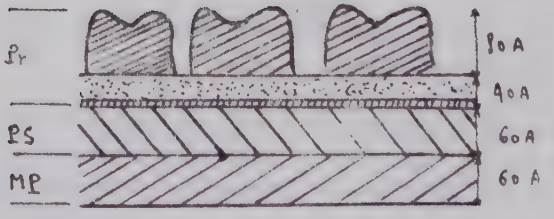
On peut retrouver aussi des acides teichoïques, de ribitol ou de glycérol ; la composition de ces acides teichoïques varie aussi quant aux corps associés : glucose, alanine, galactosamine.

On peut retrouver aussi des polysaccharides (la substance C du Streptocoque) parfois associés à des protéines (substance M du Streptocoque).
Les substances associées au peptidoglycane ne forment pas à elles seules une structure cohérente, de sorte que si le peptidoglycane est détruit, ces substances se solubilisent et la paroi disparait totalement.
Dans la plupart des cas, elles ne forment pas de structure anatomique individualisée. Toutefois, des travaux récents de NERMUT sur B. megatherium et de NERMUT et MURRAY sur B. polymyxa ont permis l'observation de plusieurs couches (figures 2 et 3).



TA: ac. teichiques - MP: mucopeptide

figure 2 (NERMOT)



Pr: Protéine; PS: polysaccharide; MP: mucopeptide.

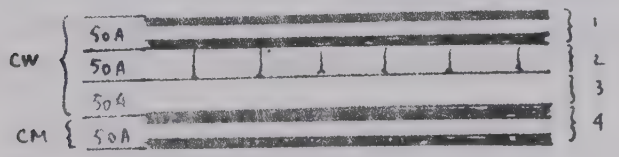
figure 3 (NERMUT et MURRAY)

2.- CHEZ LES GRAM NÉGATIFS

La structure de la paroi est encore plus complexe comme le suggère, d'ailleurs, sa structure au microscope électronique.

Le mucopeptide y est toujours présent, mais il ne représente qu'une faible fraction du total (en moyenne 10 %), chez certaines espèces pas plus de 5 %.
Des protéines, lipides et polysaccharides lui sont souvent associés sous forme d'un complexe glucido-lipido-polypeptidique, mais pas, du moins à ce que l'on sait, d'acides teichoïques.
Ces différents éléments sont disposés en couches individualisées, situées en surface par rapport au mucocomplexe.

C'est ainsi que d'après MURRAY et DE PETRIS, la structure superficielle de la paroi, constituée comme nous l'avons décrit plus haut de trois couches (une couche claire entre deux couches opaques en microscopie électronique), serait de nature lipoprotéique. Quant à la partie profonde de la paroi, colorée seulement par traitement des coupes par le nitrate de lanthane ou l'acétate d'uranyle, elle serait constituée de deux couches superposées ; une couche externe immédiatement sous jacente à la couche lipoprotéique serait de nature protéique ("couche globulaire protéique") et une couche profonde au contact de la membrane cytoplasmique qui correspondrait au mucocomplexe. (fig.4).



CW : Paroi : (1) couche lipoprotéique, (2) couche globulaire protéique, (3) mucocomplexe
CM : membrane cytoplasmique.

figure 4 (de Petris)

Le polysaccharide n'est pas situé avec précision, : soit associé à la couche superficielle, soit associé à la couche globulaire protéique.
Au contraire, de ce qui a été dit pour les gram positives, chez les gram négatives, les éléments associés au mucocomplexe, constituent une structure, certes fragile, mais relativement cohérente qui persiste après dissolution du mucocomplexe.

3.- Chez les Microbactéries

Des cires se trouvent aussi associées à la paroi.

+

+ +

En fait, si certaines de ces substances associées au mucocomplexe peuvent paraître des accessoires sans utilité, la plupart ont un rôle biologique important.

- Beaucoup d'entre elles sont des antigènes responsables de spécificités immunologiques ;
- D'autres constituent les récepteurs des bactériophages ;
- Certaines sont de puissantes endotoxines tel le complexe glucido-lipido-protidique.

IV.- SYNTHESE DU MUCOPEPTIDE

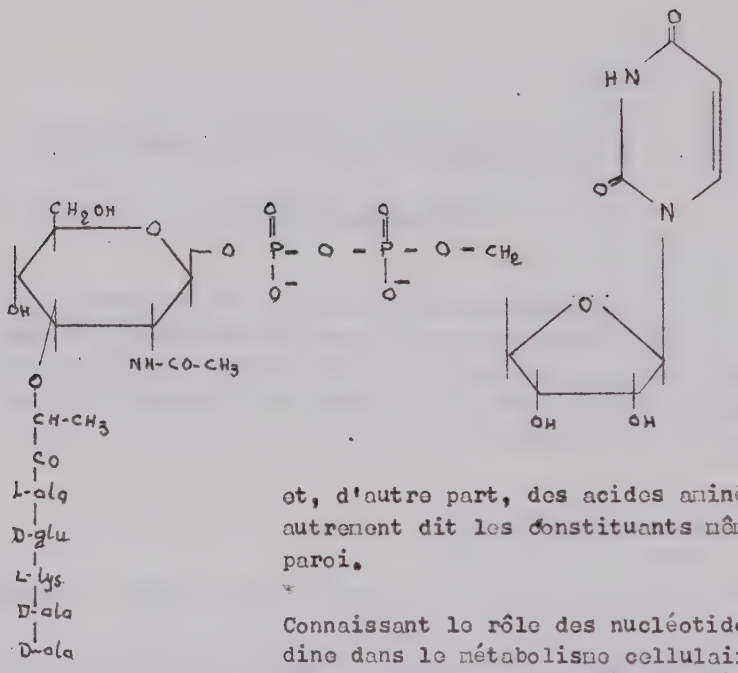
La connaissance de la synthèse du mécanisme, élucidée ces dernières années est d'un grand intérêt théorique. Elle a permis notamment, de comprendre le mode d'action d'un certain nombre d'antibiotiques. Ces études ont eu essentiellement pour objet le Staphylococcus aureus.

I.- MÉTHODES D'ETUDE

Le problème a été abordé par deux voies principales.

a.- Analyse des produits s'accumulant dans le milieu en présence d'inhibiteurs de la synthèse de la paroi.

Les recherches ont eu pour point de départ des observations faites sur des bactéries traitées par la pénicilline en milieu hypertonique. On observa que dans ces conditions, les bactéries donnaient naissance à des organismes sphériques très sensibles au choc osmotique.
On en conclut que la pénicilline est l'inhibiteur de la synthèse de la paroi.
Parallèlement à ces observations morphologiques, on s'aperçut qu'il s'accumulait dans le milieu un nucléotide d'uridine ayant la formule suivante : diphospho-uridine-acide acétyl muramique-pentapeptide.



et, d'autre part, des acides aminés D., autrement dit les constituants mêmes de la paroi.

Connaissant le rôle des nucléotides d'uridine dans le métabolisme cellulaire en général, on en a déduit que ce nucléotide d'uridine devait être le précurseur de la paroi et qu'il s'accumulait ainsi en raison d'un blocage de la chaîne métabolique correspondant à la synthèse de cette paroi, blocage dû à la pénicilline.

Ceci a été largement confirmé par des expériences avec des corps marqués, aussi bien chez les bactéries gram positives que chez les gram négatives.

On s'est aperçu ensuite que d'autres antibiotiques provoquent aussi l'accumulation de nucléotides d'uridine :

- soit identique au précédent,
- soit légèrement différent quant à la longueur de la chaîne peptidique qu'il comporte.

Ce sont les pénicillines et céphalosporines, la bacitracine, la D-cyclosérine, la Vancomycine, la Ristocétine, la novobiocine.

L'étude de la formule de ces nucléotides, indique dans chaque cas l'existence d'un cycle de réactions qui conduit à la formation de l'UDP-acétylmuramyl-pentapeptide- cycle qui peut être bloqué par ces agents en différents points.

Un autre type de blocage - nutritional celui-là - est important. C'est la carence en lysine. Le manque de lysine conduit à l'accumulation d'un nucléotide différent de celui qui s'accumule dans les cas précédents (il lui manque les trois derniers acides aminés).

b.- Analyse des produits libérés par hydrolyse enzymatique partielle

A côté de l'étude des produits s'accumulant en présence d'inhibiteurs de la synthèse, on a pu aussi étudier ceux que libère l'hydrolyse enzymatique partielle du mucocomplexe. On a isolé, en effet, nous y reviendrons plus loin, de tissus et sécrétions animaux et végétaux, et même des bactéries, des substances enzymatiques capables d'hydrolyser le mucocomplexe.

Avec ces intermédiaires en mains, il devenait possible de tenter de déchiffrer le mécanisme de la synthèse de la paroi, et tout d'abord de ces nucléotides.

2.- LES RÉACTIONS SUCCESSIVES SONT LES SUIVANTES :

Artificiellement, nous pouvons les schématiser en trois étapes.

LA - PREMIERE ETAPE

Elle aboutit à la formation de l'UDP-acide acétyl muramique-pentapeptide.

- Formation d'acétyl glucosamine-1-P à partir de fructose-6-P

- Formation d'UTP à partir de UMP + Phosphate par réaction de phosphorylation.

- Conjugaison de cet acétyl glucosamine-1-P à l'UTP ⟶ UDP-acétyl glucosamine.

- Transformation de l'acétyl glucosamine UDP en acide acétyl muramique UDP
  - par fixation de phosphoénolpyruvate
  - puis transformation du radical ainsi fixé en radical lactyl.

- Addition successive des acides aminés du pentapeptide
  - d'abord d'une molécule de L-alanine
  - puis d'une molécule d'acide D-glutamique, ce qui nécessite la transformation préalable de l'acide L-glutamique normal en D par une racémase.
  - puis, d'une molécule de L-lysine
  - enfin, d'un dipeptide de D-alanine.
    Ce dipeptide de D-alanine doit être formé à partir de la L-alanine en 2 réactions :

    L-alanine $\rightleftharpoons$ D-alanine
    (réaction contrôlée par une racémase)

    2-D-alanine + ATP $\rightleftharpoons$ D-alanine-D-alanine + ADP + P
    (réaction contrôlée par une D-alanyl-D-alanine-synthétase).

Ainsi, on a obtenu l'UDP acide acétyl muramique pentapeptide c'est-à-dire le nucléotide que l'on voit s'accumuler au cours du traitement par la Pénicilline, "le précurseur".

DEUXIEME ETAPE :

Formation des chaines polysaccharidiques.

- l'UDP acide acétyl muramique pentapeptide paraît tout d'abord se coupler à un phospholipide présent dans la membrane cytoplasmique.

  Ce phospholipide sert d'accepteur pour la fraction (acide acétyl muramique-pentapeptide-P du nucléotide.

Il se forme ainsi un premier complexe lipidique intermédiaire :
acide acétyl muramique (pentapeptide)-P-phospholipide.

- A ce premier complexe lipidique intermédiaire s'adjoint une molécule d'acétyl glucosamine transférée à partir d'UDP-acétyl-glucosamine avec formation d'UDP et de

disaccharide (pentapeptide)-P-phospholipide

(2è lipide intermédiaire).

- C'est alors que, dans le cas du staphylocoque, s'attache le pont de penta-glycine. In vitro, en effet, ce pont de penta-glycine ne se fixe que sur ces complexes lipidiques et non sur les nucléotides précédents ou sur le glycopeptide.
Cette fixation, du moins in vitro, a lieu sur l'un et l'autre de ces complexes lipidiques. Le deuxième étant d'ailleurs un meilleur accepteur que le premier.

La synthèse de la chaine de pentaglycine fait intervenir un acide ribonucléique de transfert.
Elle est faite à partir de glycyl-s-RNA comme intermédiaire activé. Ce pont de pentaglycine s'attache sur le NH_2 en ε de la lysine. On aboutit à un disaccharide (pentapeptide-pentaglycine-P-phospholipide).

Ce disaccharide est alors transféré à un accepteur de la paroi avec libération du phospholipide et de phosphate inorganique.

L'accepteur de la paroi est fort mal connu, sans doute s'agit-il du peptidoglycane lui-même, de ce qui en existe déjà.

Quant au phospholipide libéré, il se trouve à nouveau disponible pour se coupler à nouveau à l'UDP-acide acétyl muramique-pentapeptide : ainsi se trouve constitué le "cycle des lipides".

Ces lipides intermédiaires ont probablement un rôle dans la traversée de la membrane cytoplasmique. Il ne faut pas oublier que la paroi est un produit extra cellulaire, c'est-à-dire, située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, barrière de perméabilité.

D'autre part, les nucléotides intermédiaires sont forcément synthétisées à l'intérieur de la cellule et la membrane cytoplasmique n'est pas perméable à ces substances. Il est donc vraisemblable que "le cycle des lipides" représente le processus par lequel les précurseurs intra-cellulaires sont transportés à travers la membrane pour la synthèse d'un produit extra cellulaire.

Il ne reste plus qu'à lier entre eux ces disaccharides pentapeptide-pentaglycine pour obtenir la formation d'une chaîne polysaccharidique. Cette union se fait par réalisation de liaisons osidiques $\beta 1 - 4$ entre la molécule AG d'un disaccharide et la molécule AAM d'un autre disaccharide (réaction de transglycosylation).

Ainsi est réalisée la chaîne polysaccharidique où alternent de façon régulière AG et AAM ; ce dernier porte fixé sur son radical lactyl une chaine peptidique. Cette dernière chaine est, rappelons le, un pentapeptide dont la séquence est L-Ala-D-glu-L-lys-D-Ala-D-Ala, avec, branchée sur la L-lysine, une chaine de cinq molécules de glycocolle.

TROISIEME ETAPE

Union des chaines entre elles.

Ceci semble être la dernière réaction de l'assemblage de la paroi ; elle consiste en la réalisation d'une liaison peptidique entre l'extrémité libre du pont pentaglycine avec l'extrémité d'un pentapeptide d'une autre chaine.

Cette réaction est une réaction de transpeptidation comportant la perte d'une molécule de D-alanine par le pentapeptide qui devient un tétrapeptide.

Ainsi, la fermeture du pont est couplée avec la perte d'une molécule de D-alanine. Il est probable que c'est l'énergie libérée par la rupture de la liaison D-alanine-D-alanine qui est utilisée pour la transpeptidation. Cette hypothèse est très séduisante car il est évident que la fermeture du pont doit se produire à l'extérieur de la membrane cellulaire, c'est-à-dire à un endroit où l'adénosine triphosphate n'est très certainement pas présente pour fournir l'énergie nécessaire.

Toutes les étapes de cette synthèse sont catalysées par des enzymes, la dernière par une transpeptidase

3.- POINTS D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES INHIBITEURS DE CETTE SYNTHÈSE

Plusieurs antibiotiques semblent avoir comme effet primaire un rôle inhibiteur sur une des étapes de cette synthèse du mucopeptide. Ceci est prouvé actuellement pour les pénicillines, céphalosporines, ristocétine, vancomycine et cyclosérine.

- La cyclosérine agit à un stade relativement précoce de la synthèse de la paroi. Elle se comporte comme un antagoniste compétitif des deux enzymes impliquées dans la synthèse du dipeptide D-ala-D-ala-.
  Ceci en raison de l'analogie de structure entre la D et L-alanine et la cyclosérine.

- La ristocétine et la vancomycine agissent à un stade beaucoup plus tardif. Elles inhibent l'utilisation du disaccharide pentapeptide-P-phospholipide, c'est-à-dire qu'elles empêchent la formation des chaines disaccharidiques, bloquant ainsi la croissance de la paroi en longueur. Il semble que d'après des travaux récents, elles agissent en inhibant la déphosphorylation du complexe phosphate-phospholipide à la fin du cycle des lipides. Le phospholipide n'étant plus régénéré le cycle des lipides est désamorcé.
  On peut noter que la ristocétine et la vancomycine contiennent des acides aminés et des sucres, c'est-à-dire que ce sont eux-mêmes des glycopeptides.

- Les pénicillines et les céphalosporines agissent au stade terminal de la formation de la paroi, en bloquant la réaction de transpeptidation. On dit qu'elles inhibent la croissance de la paroi en épaisseur. Il est très vraisemblable que la pénicilline agit comme analogue structural du dipeptide D-alanine-D-alanine.

  Il est probable que par suite de cette analogie de structure la pénicilline se combine à la transpeptidase qui, normalement fixe le dipeptide D-ala-D-ala (extrémité du pentapeptide) et bloque son action donnant un complexe pénicilline-enzyme irréversible.

- La bacitracine et la novobiocine semblent bien inhiber aussi, dans une certaine mesure, la synthèse de la paroi bactérienne, mais, il ne semble pas que ce soit leur point d'action primaire ; les perturbations qu'elles provoquent dans ce domaine sont plus vraisemblablement la conséquence de leur action sur la membrane cytoplasmique (par l'intermédiaire du phospholipide).

Notons que la synthèse de la paroi n'est pas inhibée par les antibiotiques connus pour inhiber les synthèses protéiques (chloramphénicol, tétracyclines). Ce qui laisse supposer que la synthèse du peptide pariétal ne suit pas les lois des autres synthèses protéiques.

V.- ROLE DE LA PAROI

La paroi bactérienne est le support d'importants antigènes bactériens : les antigènes somatiques, nous venons de le voir.

Elle partage ce rôle antigènique avec d'autres constituants de la bactérie - constituants de surface : capsule - flagelles.
Mais la fonction essentielle de la paroi est une fonction de protection de la cellule.

- Elle lui donne sa forme et sa rigidité.

- Elle lui permet de résister à la lyse osmotique en milieux iso et hypotoniques.

Ce rôle est bien mis en évidence par différentes expériences consistant :

- soit à "dissoudre" la paroi,

- soit à inhiber sa synthèse.

ou bien encore par l'étude de bactéries ayant perdu, par mutation, la possibilité de synthétiser une paroi.

1.- HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU MUCOPEPTIDE

La "dissolution" de la paroi peut être obtenue par hydrolyse enzymatique du mucopeptide.

Trois groupes d'enzymes (d'hydrolases) peuvent réaliser cette dégradation :

- des glucosidases ou carbohydrases qui vont hydrolyser les chaines polysaccharidiques en rompant la liaison osidique unissant

soit l'acide acétyl muramique à l'acétyl glucosamine (l'enzyme est alors une endo-N-acétyl muraminidase),

soit l'acétyl glucosamine à l'acide acétyl muramique (l'enzyme est une endo-N-acétylglucosaminidase).

Ces glucosidases muralytiques sont connues depuis assez longtemps déjà, l'une d'elles notamment : le lysozyme. Elles sont largement répandues chez les animaux et les plantes, et chez les bactéries en particulier les Streptomyces.

- Des peptidases, actives sur les parois bactériennes n'ont été mises en évidence que plus récemment (1962). On les a isolées essentiellement de produit d'autolyse de cultures bactériennes. Ce sont des endopeptidases. Elles rompent les liaisons existantes entre les tétrapeptides,

  - soit à l'intérieur des ponts peptidiques, comme le pont pentaglycine (exemple : la lysostaphine enzyme extrait de certaines souches de staphylocoque).

  - soit les liaisons directes (DAP - D-alanine),

  mais on n'en a pas trouvé jusqu'ici qui coupent à l'intérieur du tétrapeptide (peut-être en raison de la présence de deux acides aminés ayant la configuration D).

- Des acétyl muramyl-L-alanine amidases. Elles coupent la liaison entre l'acide acétyl muramique et la molécule de L-alanine du tétrapeptide.

EXEMPLE DU LYSOZYME

C'est l'enzyme muralytique le plus ancien et le mieux connu.

- Découvert par FLEMING en 1922, le lysozyme est un enzyme contenu dans le blanc d'oeuf, mais aussi dans les larmes, le mucus nasal, le colostrum. Il a pour propriété principale de lyser les bactéries.

- Cette propriété est due au fait qu'il hydrolyse la chaine polysaccharidique du mucocomplexe. C'est une endo-acétyl-muraminidase, c'est-à-dire qu'il coupe les liaisons situées entre AAM et AG.
De ce fait, si on traite des parois isolées de bactéries gram positives, dont la majeure partie est constituée par le mucopeptide, on les voit se dissoudre complètement.

- En 1952, TOMCSIK traite par le lysozyme une souche de B. megatherium (donc des bactéries entières) :

  - en milieu isotonique - Il voit les bactéries gonfler, le cytoplasme s'arrondir à l'intérieur de la paroi qui est progressivement digérée par l'enzyme.

    Les masses sphériques du cytoplasme sont libérées dans le milieu, où elles éclatent en libérant des membranes vides.

  - en milieu hypertonique - Mais si ce traitement est appliqué en milieu rendu hypertonique par du saccharose (0,1 - 0,2 M) ou du polyéthylène-glycol (7,5 %) (Weibull 1952), la dissolution de la paroi n'est pas suivie d'éclatement.
Les formes rondes, globuleuses, libérées, persistent longtemps dans le milieu si on ne le dilue pas. La dilution par de l'eau distillée, par contre, entraine leur lyse.

    Ces formes rondes, globuleuses sont des
    PROTOPLASTES

De telles expériences ont été réalisées avec les mêmes résultats avec de nombreuses bactéries gram positives.

Des expériences semblables ont été réalisées avec des bactéries gram négatives, on obtient des résultats comparables :

la dissolution du mucopeptide par le lysozyme conduit aussi à la formation de formes globuleuses qui se lysent en milieu non hypertonique, qui subsistent en milieu hypertonique.

Seulement l'action du lysozyme laisse subsister la couche lipo-polysaccharidique et protéique de la paroi, de sorte que les "protoplastes" ainsi obtenus ont des propriétés un peu différentes des précédents ; on les nomme SPHEROPLASTES.

Ces sphéroplastes ont encore des restes de paroi que l'on voit en microscopie électronique. D'ailleurs, si la pression osmotique du milieu est progressivement diminuée, de vrais protoplastes émergent d'abord de l'intérieur du sphéroplaste qui, finalement, lorsqu'une grande dilution est atteinte éclate, libèrant dans le milieu des éléments de paroi composés de la partie non peptidoglycanique de la paroi.

Il faut donc retenir les définitions suivantes :

- PROTOPLASTE STRICTO SENSU : forme globuleuse, entièrement dépourvue de paroi, obtenue à partir des bactéries à gram positives.

- SPHEROPLASTES : formes sphériques des bactéries à gram négatives chez lesquelles l'action du lysozyme laisse subsister la couche lipo-polysaccharidique et protéique externe.

Mais on voit le terme de protoplaste utilisé dans un sens large correspondant à un ensemble protoplaste au sens strict et sphéroplaste.

Ces expériences montrent bien l'importance du mucopeptide dans le maintien de la forme et de la rigidité de la paroi bactérienne et sa résistance mécanique.

2.- INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DE LA PAROI PAR LES ANTIBIOTIQUES

Une autre façon d'obtenir la transformation d'une forme bactérienne normale en "protoplastes" est de traiter les bactéries, dans un milieu permettant leur croissance, par un antibiotique inhibant la synthèse du mucopeptide : Pénicilline, ristocétine - vancomycine, cyclosérine.

Cultivées dans de telles conditions, les régions synthétisées de la paroi sont privées de mucocomplexe et par conséquent de rigidité. On obtient des cellules bizarres, avec hernies du cytoplasme en ces régions.

En milieu hypotonique ou isotonique, on obtient la lyse, en milieu hypertonique la formation de "protoplaste".

Ceci explique que la Pénicilline ne soit active que sur les bactéries en multiplication : si le milieu ne permet pas la croissance, la bactérie, en présence de pénicilline, survit sous sa forme normale. Cet antibiotique, qui ne parait pas avoir d'autres effets, est inoffensif pour l'organisme supérieur, lequel ne possède pas de mucocomplexe.

3.- Blocage Génétique de la Synthèse de la Paroi

Les "protoplastes" obtenus à partir de bactéries normales sous l'action d'un agent extérieur - enzyme ou antibiotique - peuvent être qualifiés de phénotypiques.

On a à faire au contraire à des "protoplastes" génotypiques, lorsque la déficience de la paroi provient d'une incapacité génétique à synthétiser une paroi normale.

On connait, en effet, des mutants bactériens incapables par exemple de synthétiser le DAP (DAP^-) ou la N-acétylglucosamine (AG^-)

Ces mutants font des protoplastes qui se lysent en milieu hypotonique ou prennent des formes anormales (Lactobacillus bifidus), lorsque le métabolite dont ils ne savent faire la synthèse n'est pas apporté dans le milieu.

4.- Propriétés des Protoplastes et Spheroplastes

Qu'ils soient phénotypiques ou génotypiques, protoplastes et sphéroplastes ont des propriétés très voisines.

Ce qui distingue protoplastes et sphéroplastes, nous l'avons vu, c'est que :

- dans le cas des protoplastes, la paroi a complètement disparu,
- alors que dans les sphéroplastes, il persiste ce qui n'est pas le mucopeptide.

Mais comme c'est le mucopeptide qui donne sa résistance à la paroi, il y a assez peu de différence.

a.- Ils ont la même morphologie : sphérique.

b.- La même fragilité au chocs
- osmotique,
- mécanique.

c.- Ils ont une capacité normale de synthétiser protéines et acides nucléiques : donc ils sont capables de croitre.

d.- Mais ils ont une capacité très restreinte à se diviser.

Impossible en général en milieu liquide, leur division est parfois possible dans les milieux semi-solides et hypertoniques. La division se fait par une sorte de bourgeonnement, car il n'y a pas formation de septum.

On admet que la scission se fait grâce aux fils de gélose du milieu, ce qui explique que la division ne se fasse pratiquement pas en milieu liquide. On observe alors la formation de microcolonies à croissance lente, à centre dense, incrusté dans la gélose et contenant un mélange de "protoplastes" et de granules libérés par l'éclatement d'une partie de ces "protoplastes". (colonie L).

Protoplastes au sens strict et Sphéroplastes ont-ils la même aptitude à se diviser ?

Cette capacité de division, de toute façon réduite, est certainement plus faible chez les protoplastes vrais, plus fragiles. On a même, il y a quelques années, inclus dans la définition des protoplastes l'impossibilité de se diviser.

Il semble qu'ils puissent le faire tout de même faiblement (SCHAEFFER).

5.- Protoplastes et Sphéroplastes sont capables d'assurer la multiplication des bactériophages, mais

- les protoplastes au sens strict, dépourvus de paroi, donc des récepteurs, ne fixent plus les phages ;
- pour les sphéroplastes, résultats contradictoires : tout dépend probablement du degré d'altération de la paroi.

6.- Reste la question de la réversion vers la forme bacillaire normale.

- La réponse est simple pour les "protoplastes génotypiques".

Ils sont stables et ne réversent jamais en masse vers la forme normale.
(Lorsque l'on ajoute au milieu DAP pour un DAP^- ou AG pour un AG^-, la réversion que l'on observe est toute temporaire).

Par contre, on peut voir survenir une mutation réverse, qui restaure la capacité de synthèse, mais qui est un phénomène rare.

- Pour les "protoplastes" phénotypiques, la réponse est plus difficile.

On observe indiscutablement, dans certains cas, une réversion en masse, à 100 %, lorsque l'on supprime l'agent inducteur : pénicilline ou lysozyme.

Cependant, tous les "protoplastes" phénotypiques ne semblent pas réverser.

On a même dit que les protoplastes au sens strict ne réversaient pas, on en a fait une question de définition.

La question n'est pas claire. Il semble bien que si la destruction ou l'inhibition de synthèse de la paroi a été vraiment totale, la bactérie puisse avoir perdu jusqu'à "l'amorce" de la paroi, amorce dont on ne connait pas bien la nature, mais qui est peut-être, nous l'avons vu, une trace de peptidoglycane.

Quand cette amorce est perdue, rien ne sert d'enlever la Pénicilline. Ceci expliquerait que la Pénicilline puisse provoquer dans une population bactérienne l'apparition d'une forte proportion de protoplastes "stables", réversant à un taux faible.

On peut sélectionner ces protoplastes stables par passages successifs sur milieu additionnel de pénicilline et l'on peut concevoir que cette sélection de formes stables ne soit pas forcément une sélection de mutants.

A D D E N D A (1)

Chez E. coli, la réaction de transpeptidation se fait directement entre la D.alamine d'une unité peptidique et le meso-DAP d'une unité peptidique d'une autre chaîne.

D'autre part, les chaînes de peptidoglycane s'unissent par deux seulement (formant seulement des dimères et non un polymère comme chez le Staphylocoque). La réaction de transpeptidation est alors suivie du décrochage du deuxième résidu D.alanine de la deuxième unité peptidique, sous l'effet d'une D.alanine carboxypeptidase.

AG - AAM - L.Ala - D.Glu - Meso.DAP - D.Ala - D.Ala
+
AG - AAM - L.ala - D.glu - meso DAP - D.ala - D.ala

↓ ← Transpeptidase

AG - AAM - L.ala - D.glu - meso DAP - D.ala
AG - AAM - L.ala - D.glu - meso DAP - D.ala - D.ala + D.ala

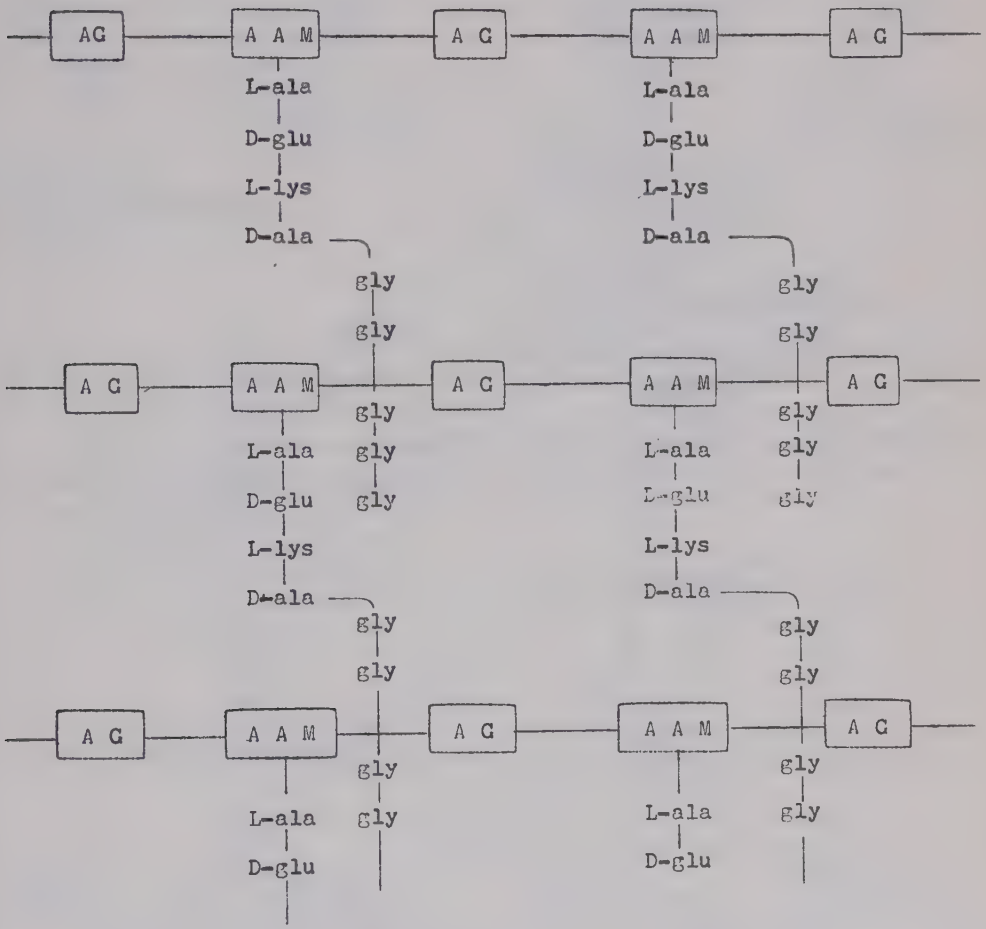
↓ ← D.alanine carboxypeptidase

AG - AAM - L.ala - D.glu - meso DAP - D.ala
AG - AAM - L.ala - D.glu - meso DAP - D.ala + D.ala

(1) - STROMINGER, J.L., KAZUO IZAKI, MATSUHASHI M. and TIPPER, D.J.

Fed. Proceed. 1967, 26, 1.

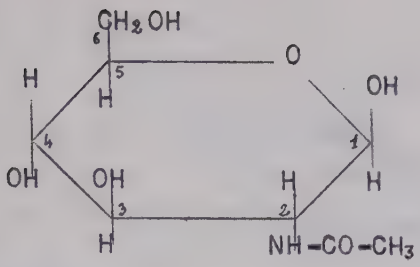
SCHEMA DE LA STRUCTURE DU MUCOPEPTIDE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS



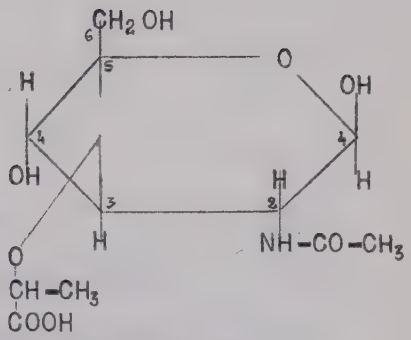
A G = N-acétyl-glucosamine

A A M = Acide N-acétyl-muramique

AAM
AG
AAM
AG
AAM
AG
AAM
AAM
AAM
AAM



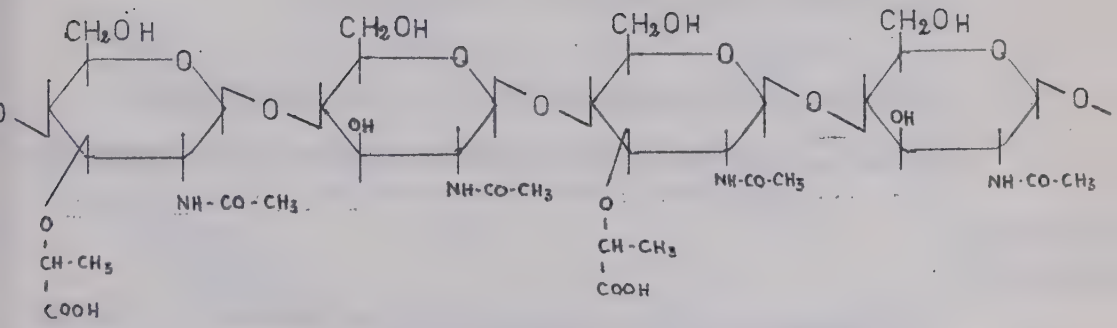
N-Acétyl-Glucosamine

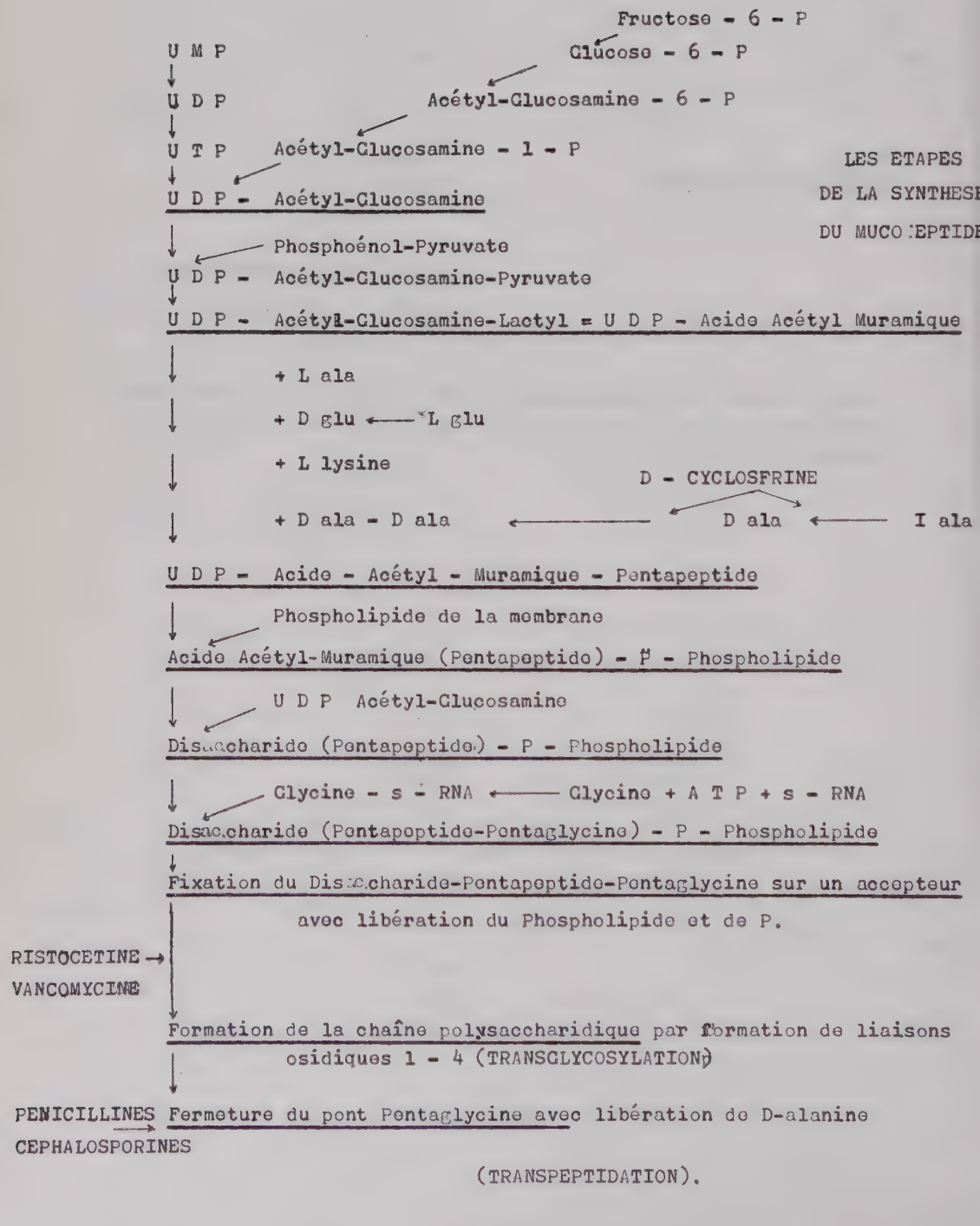


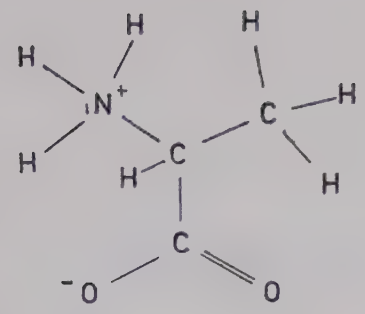
ACIDE N-Acétyl-Muramique

(= N-Acétyl - Glucosamine + Lactyl)

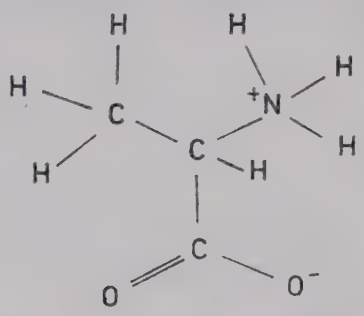
Dans la chaîne polysaccharidique - "épine dorsale" du mucopeptide - ces deux molécules alternent et sont liées entre elles par des liaisons osidiques 1 - 4 :




Fructose - 6 - P
U M P
Glucose - 6 - P
U D P
Acétyl-Glucosamine - 6 - P
U T P
Acétyl-Glucosamine - 1 - P
U D P - Acétyl-Glucosamine
LES ETAPES
DE LA SYNTHESE
DU MUCOPEPTIDE
Phosphoénol-Pyruvate
U D P - Acétyl-Glucosamine-Pyruvate
U D P - Acétyl-Glucosamine-Lactyl = U D P - Acide Acétyl Muramique
+ L ala
+ D glu
L glu
+ L lysine
D - CYCLOSERINE
+ D ala - D ala
D ala
I ala
U D P - Acide - Acétyl - Muramique - Pentapeptide
Phospholipide de la membrane
Acide Acétyl-Muramique (Pentapeptide) - P - Phospholipide
U D P Acétyl-Glucosamine
Disaccharide (Pentapeptide) - P - Phospholipide
Glycine - s - RNA
Glycine + A T P + s - RNA
Disaccharide (Pentapeptide-Pentaglycine) - P - Phospholipide
Fixation du Disaccharide-Pentapeptide-Pentaglycine sur un accepteur
avec libération du Phospholipide et de P.
RISTOCETINE
VANCOMYCINE
Formation de la chaîne polysaccharidique par formation de liaisons
osidiques 1 - 4 (TRANSGLYCOSYLATION)
PENICILLINES
CEPHALOSPORINES
Fermeture du pont Pentaglycine avec libération de D-alanine
(TRANSPEPTIDATION).

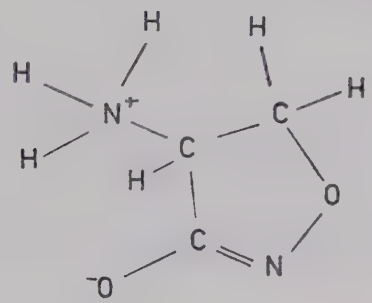


D-alanine

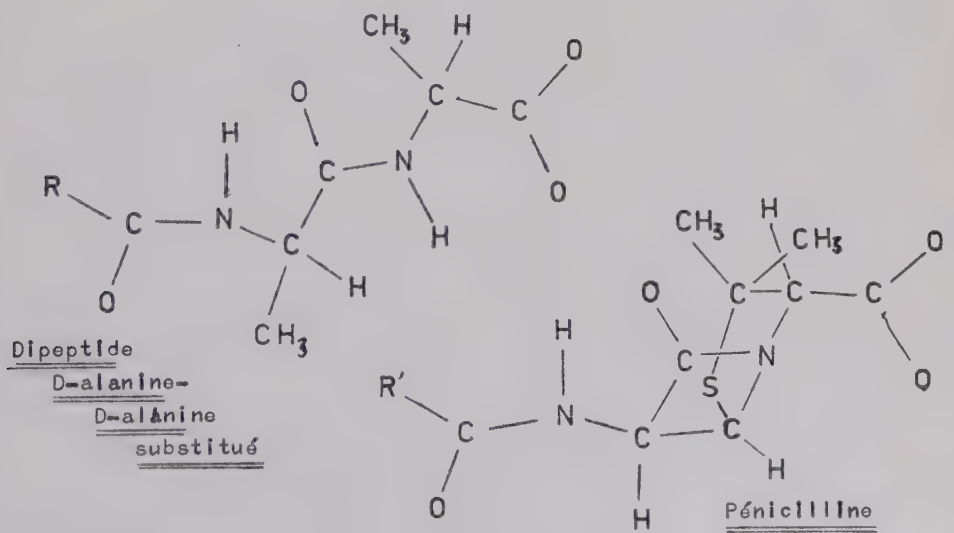


L-alanine

D-cyclosérine



Formules comparées de la D-alanine, de la L-alanine et de la D-cyclosérine. L' analogie de ces formules explique l'action de la D-cyclosérine.



Dipeptide D-alanine-D-alanine substitué

Pénicilline

Formules comparées de la pénicilline et du dipeptide de D-alanine substitué. L'analogie de ces formules explique probablement l'action de la pénicilline.

CHAPITRE QUATRIEME

LA CAPSULE
et
LES COUCHES DE SURFACE

INTRODUCTION

Certaines bactéries secrètent des polymères organiques de solubilité aqueuse limitée, qui constituent une couche externe par rapport à la paroi.

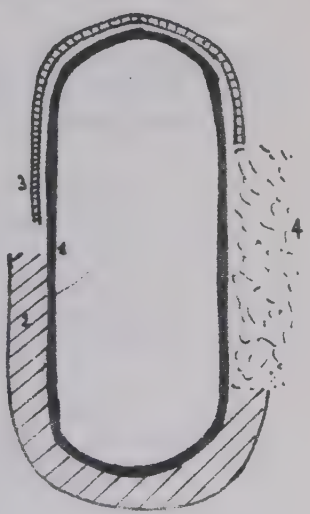
Il n'est pas toujours facile de définir avec précision une telle structure, car :

- elle est plus ou moins bien définie "anatomiquement" ;
- elle n'apparaît souvent que dans certaines conditions de culture.
- elle peut être d'existence transitoire.
- elle peut être plus ou moins développée pour une même espèce bactérienne
  - . tantôt visible "anatomiquement".
  - . tantôt si mince que son existence ne sera démontrée que par des moyens immunologiques ou chimiques.

En pratique, on donne à cette couche externe supplémentaire le nom de CAPSULE lorsqu'elle constitue une structure bien limitée.

Dans certains cas, les substances secrétées sont beaucoup plus abondantes et diffuses, et noient en quelque sorte la bactérie dans une sorte de mucus (Cf.Str.salivarius) : "Loose slime".

Dans d'autres cas, l'épaisseur de la couche de surface est très faible, à la limite de résolution du microscope optique (0,2 μ). Elle est appelée : MICROCAPSULE.



1: paroi ; 2: capsule ; 3: microcapsule
4: Loose slime

MISE EN EVIDENCE

1.- Les constituants des capsules et des couches de surface ont en général une très faible affinité pour les colorants nécessitant diverses techniques de coloration : fuchsine - bleu de méthylène, coloration au bleu de Borrel, coloration à l'éosinate de bleu de Borrel. Sur une coloration banale, il importe de ne pas conclure à tort à une capsule sur un simple halo clair autour de la bactérie, car un artéfact de fixation peut conduire à une erreur.

2.- La meilleure mise en évidence d'une vraie capsule est encore la méthode à l'encre de Chine.

3.- Tout ceci ne révèle pas la structure intime de la capsule, qui apparait en général amorphe.

4.- Le microscope électronique le plus souvent ne montre guère plus : la capsule est en général mal visible, et mal définie : faible indice de réfraction. Sauf exceptions, elle est en général moins dense que le cytoplasme.

5.- Cependant, dans certains cas, rares, on a pu montrer que les capsules ne sont pas toujours la simple accumulation de substances amorphes, et observer une certaine structure.

- C'est le cas, par exemple, de la capsule de la souche Lisbonne de Colibacille, dans laquelle on a pu mettre en évidence, au sein de la matrice capsulaire, des structures faites de fibres striées, disposées plus ou moins perpendiculairement à la surface bactérienne.

- TOMCSIK avec B. megaterium, modifie l'indice de réfraction de la capsule par antisérum et observe en contraste de phase :

La capsule a une structure complexe, faite de deux composés différents : polypeptide et polysaccharide.

Ces deux composés ne sont pas disposés en couches concentriques, mais le polysaccharide se trouve localisé par fragments à certains endroits à l'intérieur du polypeptide.

- Une autre souche de B. megaterium étudiée par IVANOVICS possède une capsule où l'on voit des indentations régulières le long de la surface.

COMPOSITION CHIMIQUE

La composition chimique varie beaucoup selon les espèces bactériennes ; est caractéristique de chacune. Les constituants sont avant tout :

- soit des polysaccharides,
- soit des polypeptides.

I.- BACTERIES GRAM POSITIVES

1.- PNEUMOCOQUE

Les capsules des pneumocoques ont été très étudiées.

De nombreux polysaccharides spécifiques de type ont été détectés par immunologie, et beaucoup ont été isolés et définis chimiquement (80 types environ).

Ces polysaccharides ont un poids moléculaire élevé de l'ordre de 1000 000 pour les types I - II - III.

Plusieurs de ces polysaccharides contiennent des sucres aminés (glucosamine en particulier), d'autres ne contiennent que des sucres simples.

Le polysaccharide du Type III a été le plus étudié. C'est un polymère d'acide cellobiuronique. (acide D-glycuronique + D-glucose liés en 1-4).

Ces polysaccharides des pneumocoques sont, selon l'espèce animale, ou antigènes ou haptènes (antigène chez l'homme et la souris).

2.- STREPTOCOQUE

- Les streptococques des groupes A et C peuvent être capsulés, mais la capsule n'est souvent visible cytologiquement qu'au début de la phase exponentielle de croissance.

  C'est une capsule faite d'acide hyaluronique (polymère de N-acétylglucosamine et d'acide glycuronique).

  Le fait que ces streptocoques secrètent une hyaluronidase explique probablement la disparition secondaire de la capsule.

- D'autres streptocoques, salivarius, sanguis et parfois bovis ou H, secrètent des mucilages

  - soit des dextranes, polymères de glucose dont le poids moléculaire est environ 1 000 000 (Str. salivarius)

  - soit des levanes, plus durs, polymères de fructose (Str. sanguis).

3.- LES BACILLUS

- B. ANTHRACIS

  produit d'une capsule dont la constitution chimique est spéciale, puisque c'est un peptide d'acide D-glutamique, liés par des liaisons peptidiques χ.

- D'AUTRES BACILLUS

  produisent aussi des capsules
  B. megatherium = polypeptide d'acide D-glutamique + polysaccharide.

- B. SUBTILIS

  n'a pas de capsule, mais il secrète aussi un peptide d'acide glutamique (D + L) qui est libéré dans le milieu, probablement parce qu'il possède un enzyme capable de le dégrader et de le solubiliser.

- CERTAINS BACILLUS PRODUISENT :

  - des substances capsulaires polysaccharidiques
    tel :
    B. circulans : polymère de mannose,
    glucose,
    et acide uronique.

  - et des mucilages de constitution variée
    tels :
    B. cereus,
    B. punibus,
    B. subtilis,
    B. megatherium.

II.- BACTERIES GRAM NEGATIVES

1.- LES KLEBSIELLA - AEROBACTER -

ont une capsule faite de polysaccharides.
Il en existe de nombreux types.

2.- CERTAINS COLIBACILLES -

sont capsulés, ceux possèdant un antigène K (type A).
Leur capsule est de nature polysaccharidique.

3.- ON PEUT EN RAPPROCHER

L'antigène Vi des Salmonelles ("microcapsule").

4.- HEMOPHILUS INFLUENZAE

a une capsule faite de polyribophosphate.

5.- CERTAINES BACTERIES (Acetobacter)

sont entourées d'une couche amorphe de cellulose qui peut ensuite cristalliser en fibrilles.

LA FORMATION DE LA CAPSULE

ou des substances capsulaires est fonction de la composition du milieu de culture.

Les milieux albumineux sont habituellement nécessaires à la formation des capsules.
Pour les streptocoques, le mucilage n'est produit que sur milieux saccharosés.

Il est remarquable que d'autres sucres fermentescibles ne permettent pas le production de ce mucilage, pas même le glucose et le fructose eux-mêmes.
L'absence de formation de capsule sur milieux non favorables correspond à une simple variation phénotypique.

ROLE DE LA CAPSULE

La capsule ne semble pas avoir un rôle direct important dans le maintien des fonctions cellulaires.

La faculté de produire une capsule peut être perdue par mutation : les cellules ne s'en multiplient pas moins. De même, on peut par hydrolyse enzymatique "enlever" la capsule de certaines bactéries : ce traitement laisse la cellule saine et sauve. Pourtant, si la capsule n'est pas indispensable à la vie cellulaire, on ne peut pas dire que son rôle soit négligeable. Elle constitue très certainement pour certaines bactéries du moins, un moyen de protection, de défense.
On le voit bien dans le cas des bactéries pathogènes capsulées. Dans le cas du Pneumocoque, seules les bactéries capsulées sont virulentes et capables de provoquer une infection chez l'animal.

Les mutants non capsulés ne sont plus pathogènes. La capsule rend la bactérie moins sensible à la phagocytose.

Il est concevable que les capsules aient un rôle analogue chez les bactéries saprophytes et leur confèrent un certain degré de protection contre la phagocytose par les protozoaires.

ENFIN, LES CONSTITUANTS CAPSULAIRES SONT SOIT ANTIGENIQUES

SOIT HAPTENES

et ils réagissent avec les anticorps correspondants.

Ce phénomène peut être utilisé pour la mise en évidence de la capsule.

Si les bactéries sont mises en contact avec l'antisérum, la capsule parait gonflée et devient plus visible, car, plus qu'un gonflement, qui est possible, c'est une opacification, une augmentation de l'indice de réfraction de la capsule qui se produit.

LES CILS ou FLAGELLES

Les bactéries mobiles doivent leur mobilité à la possession d'appendices filamenteux, les cils ou flagelles, ainsi appelés par analogie avec les organes locomoteurs des protistes supérieurs ou avec les cils ou flagelles rencontrés chez les animaux et les végétaux.

Mais leur structure en est très différente.

LES CILS DES CELLULES EUCARYOTES

Les flagelles des cellules eucaryotes sont plus gros (2 $\mu\phi$ en moyenne, parfois plus) que les flagelles bactériens, mais surtout ils ont une structure complexe.

Cette structure, fait remarquable, montre une extraordinaire constance (à quelques minimes variations près) à travers l'énorme ensemble d'êtres vivants qui les possèdent.

Les cils ou flagelles des eucaryotes sont toujours entourés d'une membrane qui est en continuité avec la membrane cellulaire.

Cette membrane renferme un système de fibrilles longitudinales comprenant toujours :

- 2 fibrilles centrales
- et 9 doubles fibrilles périphériques disposées en cercle (fig 1)

Le diamètre de chaque fibrille (centrale ou subfibrille périphérique) est de 240 Å environ.

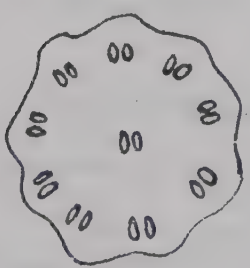


figure 1

Les 2 fibrilles centrales prennent naissance à la hauteur de la membrane cellulaire, mais les 9 fibrilles périphériques pénètrent dans le cytoplasme où elles prennent naissance dans une petite structure généralement arrondie : le blépharoplaste ou kinétoplaste ou kinétosome.
Ces blépharoplastes ne sont pas formés de novo dans le cytolasme, mais sont répliqués par division. Ils constituent une sorte de plastide.

LES FLAGELLES BACTERIENS

I.- Mode d'Observation

Les flagelles bactériens sont très fins, d'un diamètre inférieur au pouvoir de séparation d'un microscope optique ordinaire, Ils sont donc difficiles à observer.

- Il est très difficile de les observer à l'état frais -

On y parvient cependant en microscopie à fond noir ou en contraste de phase, en ralentissant le mouvement des bactéries par adjonction de gélatine ou de méthylcellulose au milieu.

- On peut les mettre en évidence par coloration par des méthodes spéciales (Leifson - Casares-Gil - Rhodes...) qui, toutes font intervenir un mordant. Il est probable qu'une précipitation du mordant et du colorant à la surface des cils augmente leur diamètre et les rend visibles.

- On peut les mettre en évidence par fluorescence -

- Enfin, le microscope électronique permet actuellement d'étudier leur structure intime :
  - soit observation directe,
  - soit après ombrage ou coloration négative.

II.- MORPHOLOGIE

- LA LONGUEUR DES FLAGELLES

peut être plusieurs fois celle du corps bactérien. Elle varie en général de 6 à 20 μ

- LEUR DIAMETRE

mesuré en microscopie électronique, varie entre 100 et 300 Å environ.

Proteus vulgaris 120 Å
Vibrio metchnikovii 300 Å

Ce diamètre est constant sur toute la longueur.

- LES FLAGELLES ONT UNE FORME ONDULEE

ou plutôt, représentée dans l'espace, hélicoïdale.

Ils ont l'apparence de filaments, parcourus continuellement par des séries d'ondes hélicoïdales, que l'on peut comparer au mouvement de rotation d'une vrille, d'un tire-bouchon.

A une telle hélice, on peut décrire une longueur d'onde et une amplitude.

La longueur d'onde est en moyenne de 0,6 à 2,5 μ et l'amplitude de 0,3 à 1 μ, mais varient de façon considérable d'une espèce à l'autre.

Par contre, elles sont assez constantes à l'intérieur d'une même espèce, bien qu'elles puissent varier avec les conditions de milieu, notamment le pH.

Parfois cependant, on observe une "biplicité", c'est-à-dire qu'une même bactérie possède des flagelles de 2 longueurs d'onde différentes, l'une 2 fois plus grande que l'autre.

- LA REPARTITION DES FLAGELLES

sur le corps bactérien varie selon les espèces et a une valeur taxonomique.

Il existe deux types principaux de ciliature :

- polaire ou parapolaire

mono ou lophotriche telle est la ciliature des vibrions, spirilles et pseudomonas

parfois aux 2 pôles (amphotriche)

- soit péritriche (ou latérale) : disposition sur tout le corps bactérien (les entérobactéries).

- LE POINT D'ORIGINE DES FLAGELLES

a été très discuté. Il est certain actuellement qu'ils sont d'origine cytoplasmique. Différentes photographies en microscopie électronique montrent bien qu'ils traversent la paroi et se terminent à l'intérieur de la membrane cytoplasmique.

De plus, les protoplastes obtenus par action du lysozyme sur des bactéries ciliées, restent ciliées, alors que la paroi a disparu sous l'action de l'enzyme.

S'attachent-ils, comme les flagelles des cellules eucaryotes, sur un granule basal, sur un blépharoplaste ?

On a cherché depuis longtemps à le savoir et déjà en microscopie optique, divers auteurs avaient cru observer de tels "granules". (figure 2).

Diverses photographies en microscopie électronique sont ensuite suggéré la présence de tels organites (sur des bactéries partiellement désintégrées, autolysées par ex..., car même en coupes fines, le contenu bactérien est trop dense pour qu'on les voie)

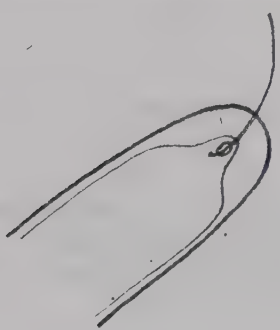
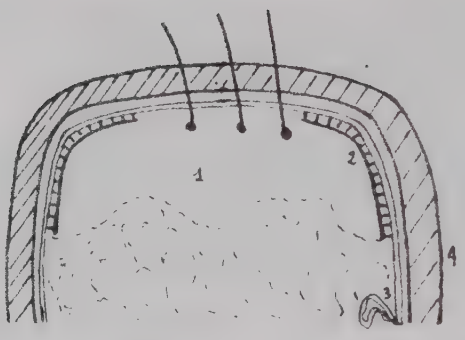


figure 2

Mais ces granules n'ont pas été toujours retrouvés ; surtout le fait qu'ils aient été vus sur des cellules altérées a fait douter de leur existence réelle. On a pensé qu'il pouvait s'agir d'artéfact.

Cependant, le problème a été repris récemment et il semble bien que de tels granules basaux existent réellement, au moins chez certaines espèces, surtout le Proteus (VAN ITERSON). Ils ont environ 50 mμ de diamètre, et le flagelle s'y insère, souvent après s'être recourbé en crochet.

Autre publication : celle de MURRAY et ses collaborateurs (1963) Ils étudient Spirillum serpens qui possède une importante touffe de cils polaires.
Trouvent que les flagelles traversent la paroi et se terminent immédiatement sous la membrane cytoplasmique. Autour de cet endroit et s'étendant sur le reste de l'extrémité de la cellule, on trouve une fine membrane polaire, sous-jacente à la membrane cytoplasmique, épaisse d'environ 200 Å. Cette membrane polaire et la membrane cytoplasmique sont réunies par de fines stries. (fig 3).



1: zone dépourvue de ribosomes; 2: membrane plasmique
3: membrane cytoplasmique ; 4: paroi

figure 3

III.- STRUCTURE FINE

De nombreuses images de microscopie électronique montrent les flagelles d'aspect lisse, uni et dénué de structure fine, mais les études de diffraction aux Rayons X ont suggéré une structure périodique, hélicoïdale.

De même, les premiers clichés au microscope électronique à fort grossissement ont montré une structure hélicoïdale (où l'on semblait voir plusieurs fibres enroulées).

Des études récentes en microscopie électronique à très forts grossissements (300 000 à 500 000) en coloration négative faites sur des flagelles de quelques espèces bactériennes:

Salmonella typhinurium
Pseudomonas
Proteus
Bacillus subtilis

ont montré qu'en fait les flagelles bactériens sont constitués de subunités globulaires, grossièrement sphériques, arrangées en lignées parallèles à l'axe du flagelle (KERRIDGE et ses col. LOWY and HANSON), mais très probablement reliés entre elles de façon hélicoïdale, conformément aux modèles suivants proposés par LOWY et HANSON.

Ces modèles sont faits d'unités sphériques de 50 Å de diamètre, arrangées de telle façon qu'elles se touchent l'une, l'autre dans les rangées longitudinales, qu'elles alternent d'une rangée à l'autre et sont connectées de façon hélicoïdale.

- Le nombre des rangées longitudinales varie selon l'espèce bactérienne

  Les deux modèles ici représentés comportent 8 à 10 rangées, mais on peut en concevoir avec des nombres différents.

  Le modèle à 10 rangées semble correspondre aux flagelles de pseudomonas fluorescens.

  Dans les autres espèces examinées, on en compte huit.

- Le nombre des hélices est la moitié de celui des rangées longitudinales

- Le nombre des unités par tour d'hélice est le même que celui des rangées longitudinales.

- L'angle de l'hélice avec l'axe du flagelle est de 60°.

Comme on le voit sur ces schémas, ces hélices ménagent au centre du flagelle un espace axial dont on discute fort la nature:

- certains pensent qu'il est creux,
- d'autres non.

Cependant, à côté de cette structure (dite structure A par les auteurs) LOWY et HANSON observent pour d'autres flagelles une structure différente (dite structure B), qui est caractérisée par la présence de lignes longitudinales très marquées l'absence de striations obliques, et le fait que les globules ne sont pas distinguables sur les clichés.

Le nombre des lignes longitudinales est le même que celui des rangées longitudinales de globules que l'on trouve dans la structure A et dépend de l'espèce bactérienne.

Existe-t-il une relation entre ces 2 types de structure ?

Ces 2 types ne sont pas fonction de l'espèce bactérienne :

En effet, chez plusieurs bactéries (Pseudomonas fluorescens Pseudomonas rhodos - Proteus vulgaris) les 2 types ont été observés.
(Chez Salmonella typhimurium type A
Chez B. sutilis type B)

Il est tentant de penser que ces deux formes de structure peuvent se transformer l'une dans l'autre par un changement de position et (ou) de nature des liaisons intermoléculaires (interunités), et qu'il se produit pendant ce changement un changement aussi dans la forme et l'orientation des molécules (unités).

En effet, si dans une préparation donnée (d'une souche donnée) on n'observe habituellement qu'un type de structure pour tous les flagelles présents, dans certains cas privilégiés (Pseudomonas rhodos), on a pu observer sur un même flagelle les 2 types de structure.

De plus, dans toutes les espèces examinées présentant la structure A, on a pu observer des variants de cette structure qui peuvent être interprétés comme des intermédiaires entre les formes A et B.

Fort prudemment, les auteurs s'abstiennent de décider si vraiment in vivo ce changement se produit, si il a quelque chose à voir avec la contraction du flagelle, et même de conclure quelle est des 2 structures celle qui est la plus proche de celle du flagelle vivant.
Mais disent-ils, "la découverte de différence structurale dans les flagelles ouvre une voie nouvelle dans l'approche du problème de la contractilité".

50 Å
25 Å
200 Å
250 Å
(a)
(a)

Enfin, pour compléter la description de cette structure intime des flagelles, il faut indiquer que parfois le flagelle peut apparaitre entouré d'une gaine, qui semble elle-même d'une structure complexe (et parait en continuité avec la paroi bactérienne).

L'existence possible d'une telle enveloppe a été décrite depuis longtemps (ROBERTIS et FRANCHI, 1951, chez Bacillus brevis),
Elle a été décrite plus récemment par GLAUERT, FOLLET, GORDON, 1963 et VAN ITERSON, 1953, chez Vibrio metchnikovii.

Retrouvée par LOWY et MANSON chez Proteus vulgaris et Pseudomonas rhodos.

On ne sait rien sur le rôle de cette gaine, mais il n'est pas impossible, étant donnée sa structure d'ailleurs complexe, probablement hélicoïdale aussi, qu'elle ne constitue pas une simple barrière de diffusion, mais qu'elle puisse faire partie du mécanisme de la contraction.

IV.- CONSTITUTION CHIMIQUE

Les flagelles bactériens peuvent être détachés mécaniquement et purifiés par centrifugation différentielle. On peut alors les analyser chimiquement.

- A quelques exceptions près, on constate qu'ils sont constitués presque entièrement de protéine : la flagelline, ayant un poids moléculaire de 30 000 à 40 000.

- Les flagelles de Spirillum serpens contiennent aussi un peu d'hydrate de carbone (1,5 %) et du RNA (2,2 %)

  Ceux de Bacillus stearothermophilus contiennent aussi un peu de glucides).

- La flagelline est donc le constituant essentiel.

L'analyse d'un certain nombre de flagellines de différentes espèces montre qu'elles sont constituées de la plupart des amino-acides avec les remarques suivantes :

- la cystéine manque le plus souvent.
- la proportion d'acides aminés aromatiques est basse.
- leur teneur en acide glutamique et aspartique est élevée (acide aspartique > acide glutamique).
- dans certaines flagellines (certaines salmonelles), on met en évidence un acide aminé particulier : la ε-N-méthyl-lysine.

Il est généralement admis que la molécule de la flagelline est de forme globulaire. Une telle forme, avec P M 40 000 et densité 1,3 donne un diamètre pour une molécule sphérique de 46 Å.

Ce chiffre est très proche des 50 Å des unités globulaires du schéma ci-dessus. De sorte qu'il est très vraisemblable que les unités du schéma correspondent à des molécules de flagelline.

Ceci paraît bien confirmé par le fait que l'on a pu récemment obtenir in vitro la formation de filaments ressemblant en tous points à des flagelles bactériens, indistinguables de vrais flagelles sur les préparations en coloration négative, à partir de molécules de flagelline en solution saline de pH convenable (neutre).

Les molécules isolées (monomères) s'organisent in vitro en filaments, par un phénomène ressemblant à la cristallisation. Il est en général nécessaire d'ajouter des fragments de flagelles pour provoquer le départ du phénomène (comme cela se voit dans certaines formes de cristallisation).

Les flagellines sont ANTIGENIQUES et constituent l'antigène H des bactéries.
Ceci montre qu'il existe un nombre immense de flagellines.

V.- Role et Mécanisme d'Action des Flagelles

Il est évident que les flagelles sont les organes locomoteurs de la bactérie.

Bien qu'une opinion inverse ait été soutenue par PIJPER pour qui les flagelles seraient non la cause mais la conséquence des mouvements bactériens (sous l'influence du mouvement, des "effilochures" de la surface bactérienne -matériel d'enveloppe ou même de paroi - s'allongeraient en filaments), tout le monde admet actuellement que les flagelles sont les organes locomoteurs.

Mais, par quel mécanisme ? Sans doute, une onde de contraction résultant probablement soit d'un changement de forme des molécules, soit d'un changement de position des molécules les unes par rapport aux autres, ou les 2 à la fois, mais rien de certain ne peut être dit actuellement sur le mécanisme de la contraction des flagelles et sur l'origine de l'énergie nécessaire.

Chez les Protozoaires, les mouvements des cils et des flagelles sont étroitement liés à l'activité respiratoire des cellules, et il est certain que la source immédiate d'énergie est constituée par l'A.T.P. comme pour la contraction musculaire.

Une activité "ATP-asique" (ATP ⟶ ADP + P) a été démontrée dans leurs cils ou flagelles, ainsi que dans la queue du spermatozoïde.

De plus, on a montré que des cils de cellules eucaryotes isolés peuvent avoir leur activité stimulée par addition d'ATP.

On a émis l'hypothèse qu'il en était de même pour les flagelles bactériens.

1.- si de nombreuses tentatives ont été faites pour rechercher dans les cils bactériens une activité ATP-asique.

Dans quelques cas, des résultats positifs ont été obtenus, mais le niveau d'activité était très faible et la possibilité d'une contamination par une phosphatase non spécifique n'a pu être éliminée.

2.- Quant aux publications rapportant la contraction de flagelles bactériens sous l'influence de l'ATP, elles sont mises en doute par de plus récents travaux (qui ont montré que l'indice de réfraction et l'aspect colloïdal des suspensions de flagelles n'étaient pas modifiés par l'ATP).

Au total, on ne sait rien sur ce point.

EN CONCLUSION :

La structure de l'appareil locomoteur est un caractère différentiel supplémentaire entre eucaryotes et procaryotes.

LES PILI

En plus des flagelles proprement dits, on peut observer la présence, chez de nombreuses bactéries gram négatives, d'autres appendices filamenteux, que l'on distingue facilement des flagelles par leur aspect :

- beaucoup plus courts et plus fins que les flagelles

  1 à 2 μ moyenne de longueur
  diamètre inférieur à 100 Å, sauf un type particulier.

- beaucoup plus rigides, non incurvés en ondes régulières.

- beaucoup plus nombreux que les cils (ils peuvent recouvrir totalement la surface de la bactérie).

Ils sont trop fins pour être vus en microscopie optique ; on ne peut les observer qu'en microscopie électronique.

Ils sont constitués uniquement de protéine : la "piline" (pour les pili type I : P M à un poids moléculaire d'environ 16 000).

Les subunités protéiques sont organisées en structure hélicoïdale, ménageant au centre un canal. Comme pour les flagelles, on peut voir, in vitro, se reconstituer des pili par repolymérisation des subunités.

La signification et le rôle des pili sont encore assez mystérieux :

- ils n'ont aucun rôle dans la mobilité ;
- ils ne sont pas indispensables à la vie bactérienne, du moins dans nos milieux de culture (on peut les enlever par agitation mécanique).

  (il est à remarquer que les souches fraichement isolées sont souvent piliées).

- ils se pourrait qu'ils soient responsables des propriétés hémagglutinantes de certaines espèces bactériennes (par fixation des bactéries sur les hématies).

En fait, on commence à entrevoir un peu leur signification, du moins pour certains.

En effet, on peut reconnaitre, d'après leur morphologie plusieurs sortes de pili.

BRINTON en décrit 6 types : I - II - III - IV - V et F. selon leur longueur, leur diamètre, leur nombre sur la cellule.

Les pili de type I et F sont les plus étudiés.

PILI TYPE I

Les pili de type I sont courts : 0,5 à 2 μ, ont un diamètre de 70 Å ; ils sont nombreux : 100 à 200 par cellule.

- Leur présence est génétiquement contrôlée par un ou plusieurs gènes, localisés sur le chromosome bactérien et la possession de pili peut être perdue par mutation.

- Bien des souches ayant ces pili I donnent des colonies de morphologie différente des autres (plus petites et plus denses).

- Les cellules piliées auraient un avantage de croissance sur les autres, du moins dans certaines conditions telles que mauvaises conditions d'oxygénation ou une densité cellulaire élevée. La raison n'est pas connue.

PILI TYPE F

Ils sont plus longs : 1 - 20 μ et terminés par un "bouton", de diamètre : 85 Å ; ils sont peu nombreux : 1 à 4 par cellule.

- Ils sont spécifiques des bactéries mâles H^+ ou Hfr possèdant l'épisome sexuel F.
  Leur présence est donc liée à cet épisome, ou aussi, comme on vient de le montrer, à celle du facteur R.

- Sur ces F-pili, et eux seuls, se fixent les phages spécifiques des bactéries mâles (petits phages RNA sans queue, et peut-être aussi des phages mâles à DNA).

  Ces phages n'infectent que les bactéries à F-pili, et il est vraisemblable que l'injection de l'acide nucléique phagique se fait par le canal du pili.

- De même, par l'intermédiaire du canal de pili type F, le facteur de résistances multiples aux antibiotiques, le facteur R.
- Selon BRINTON, ces F-pili auraient un rôle comparable au moment de la conjugaison bactérienne :

  - fixation de l'extrémité du pili sur la bactérie femelle.

  - transfert du DNA bactérien du mâle à travers le canal du pili.

CHAPITRE CINQUIEME

LA SPORE

Diverses espèces de bactéries, les Bacillus et les Clostridium, ont la propriété de fabriquer à la fin de leur période de croissance une sorte de nouvelle cellule (cellule non proliférante) à l'intérieur même de leur cytoplasme.

Cette nouvelle cellule est la SPORE (ou endospore).

Lorsque cette spore, protégée par diverses membranes, est terminée, ou "mûre", elle est libérée dans le milieu par lyse de la cellule-mère (ou sporange).

Les spores diffèrent de la forme végétative de la bactérie par leur forme, leur structure, mais aussi par un certain nombre de propriétés et notamment par leur durée de vie extrêmement longue et leur grande résistance aux différents agents physiques (chaleur, dessication) et chimiques (désinfectants, colorants).

Les spores, dit PREVOT, sont pratiquement éternelles. En effet, des spores prélevées à l'intérieur de momies embaumées et complètement desséchées depuis plusieurs millénaires ont germé et donné naissance à d'excellentes cultures après quelques heures d'incubation à 37 °.

De même, des spores prélevées sous la calotte glaciaire de l'Arctique et de l'Antarctique où elles gisaient depuis les périodes géologiques.

Même si ce sont là des cas extrêmes, les spores résistent en tout cas des années à la température ordinaire à l'état sec.

Leur résistance à la chaleur est très remarquable, très supérieure à celle de toute autre cellule connue.

Cette résistance à la chaleur varie d'une espèce à l'autre et parfois entre les souches d'une même espèce.

En suspension aqueuse, les spores résistent au moins 10 minutes à 70-80°C, et souvent plus longtemps. Certaines peuvent même résister jusqu'à deux heures dans l'eau bouillante.

Bien que les spores puissent être détruites par les ultra-violets, les rayons X et les agents chimiques, elles manifestent cependant vis-à-vis de tous ces agents une plus grande résistance que la bactérie végétative correspondante.

Ainsi, la spore apparait comme une forme de résistance qui permet à l'espèce bactérienne de survivre lorsque les conditions de milieu sont défavorables.

Lorsque ces conditions redeviennent favorables, les spores "germent" et donnent naissance à une forme végétative, qui retrouve, intactes, toutes les propriétés de la bactérie initiale, y compris l'éventuelle virulence. La spore fixe la virulence.

L'ensemble :

phase végétative
sporulation
germination

constitue le cycle sporal.

La spore n'est pas nécessaire à la propagation indéfinie de l'espèce, mais la sporulation favorise sa conservation prolongée dans des conditions incompatibles avec la croissance.

I.- MORPHOLOGIE ET STRUCTURE

- Les spores sont visibles à l'état frais grâce à leur grande réfringence.

- Elles ne sont colorables que par des techniques spéciales (technique de Moeller par exemple) et dans les colorations ordinaires, elles apparaissent comme une zone incolore et brillante, volumineuse, dont la paroi est parfois intensément coloréo.

- LEUR FORME :
  - ronde,
  - ovoïde,
  - ou cylindrique

- LEUR POSITION :
  - centrale
  - subterminale
  - terminale

- LEUR DIAMETRE par rapport à celui du corps bactérien
  - spores déformantes,
  - ou non déformantes.

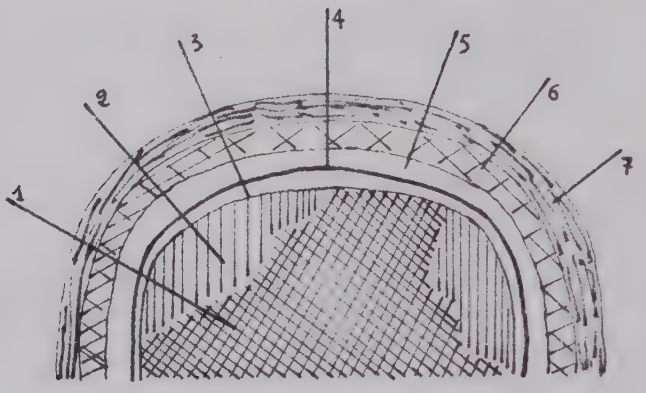
on un intérêt pour l'identification des bactéries sporulées.

- Sauf cas très rares (certaines espèces), il ne se forme qu'une spore par bactérie.

- Leur structure intime est révélée par la microscopie électronique

Les caractères morphologiques essentiels des spores mûres sont communs aux diverses espèces bactériennes étudiées qui paraissent ne différer que par la structure et le nombre des enveloppes externes.

Chez Bacillus subtilis, la structure de la spore peut être ainsi schématisée (RYTER).



1: cytoplasme sporal ; 2: materiel nucléaire ; 3 membrane sporale
4: paroi sporale ; 5: cortex ; 6: tunique interne ;
7: tunique externe. (D'après RYTER)

figure 1 (d'après RYTER)

Ce qui varie avec l'espèce, c'est donc la structure des tuniques : nombre de couches, aspect de la surface.

Cette surface peut être creusée de rainures, être d'aspect ridé ou au contraire présenter des crêtes, des épines (B. polymyxa - B. megatherium).

De plus, certaines spores sont entourées d'une fine membrane externe, l'exosporium.
C'est le cas, par exemple de B. cereus, B. mycoïdes, B. anthracis et B. thuringiensis, chez lesquels les spores sont drappées dans un "sac" fin accolé latéralement, mais qui déborde considérablement aux pôles le corps de la spore.

Des travaux récents de RODE d'une part, de HODGKISS, d'autre part, ont montré au niveau de spores de Clostridium des appendices semblables à de larges rubans.
Ces rubans sont attachés au corps sporal par un tronc commun et ont une longueur atteignant 2 à 3 fois la taille de la spore.

II.- CYTOLOGIE DE LA SPORULATION

Le développement de l'endospore bactérienne a été étudié en détail chez plusieurs espèces de Bacillus et de Clostridium en utilisant des techniques variées.

Le développement des techniques des coupes minces en microscopie électronique a permis de préciser le développement cytologique de la spore.

Citons notamment les travaux de YOUNG et FITZ-JAMES sur B. cereus, et de RYTER sur B. subtilis (1964).

Le déroulement des évènements successifs est représenté dans les schémas suivants, qui distinguent 6 stades successifs principaux :

- les 3 premiers aboutissant à la formation de ce que l'on appelle la PRESPORE intracytoplasmique.

- les 3 derniers, à la formation des enveloppes sporales.

L'ensemble du phénomène qui débute à la fin de la période de croissance dure environ 7 à 9 heures, alors que le temps d'une génération est de l'ordre de 25 minutes (puis la spore est libérée : 24 heures environ).

Nous décrivons d'abord la sporulation chez B. subtilis telle qu'elle a été observée et décrite par RYTER.

FORMATION DE LA PRESPORE

STADE 1.-

Est caractérisé par la présence d'un noyau unique de forme allongée, particulièrement volumineux, entrant parfois en contact avec 1 ou 2 mésosomes.

Selon YOUNG et FITZ-JAMES, ce noyau unique en bâtonnet résulterait de la fusion des 2 noyaux que possède habituellement la cellule bactérienne.

Une étude récente de RYTER sur le comportement des noyaux et des mésosomes au cours de la croissance et de la sporulation semble indiquer que, chez B. subtilis, le bâtonnet axial ne serait pas formé de la fusion des 2 noyaux, mais résulterait plus probablement de la réplication d'un seul noyau qui ne serait pas suivie immédiatement de la séparation des 2 noyaux-fils comme dans une division normale.

STADE 2 :

Est caractérisé par la fragmentation du noyau et la formation du septum de sporulation.

- Le noyau en bâtonnet se fragmente en 2 parties apparemment inégales

La plus petite partie migre vers un pôle de la bactérie C'est elle qui deviendra le noyau de la préspore.

Cette division inégale semble à priori curieuse puisque, cela a été démontré de diverses manières, la spore contient un seul noyau nécessairement complet.

On pourrait donc s'attendre à voir le noyau axial du stade 1 se diviser en 2 parties égales.

Cette différence de volume est réelle, confirmée par des mensurations.

Cependant, il faut noter que ces 2 fragments nucléaires paraissent avoir une structure différente :

- le futur noyau sporal (le plus petit) présente une structure beaucoup plus dense en microscopie électronique que le noyau du sporange.

- de même, en microscopie optique, il se colore beaucoup plus intensément.

Autrement dit, cette différence de volume ne correspond peut-être qu'à une différence de condensation du matériel nucléaire.

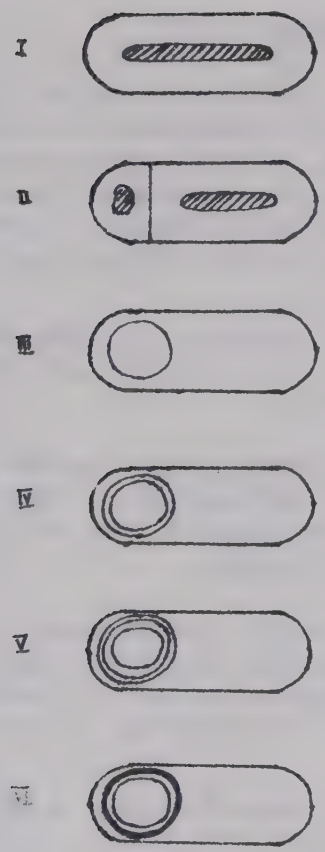


figure 2 (d'après RYTER)

- La formation du septum de sporulation se fait de façon à peu près identique chez les différentes bactéries étudiées.

Chez B. subtilis -

Le tout premier signe en est l'apparition de deux petites protubérances de la paroi, pointant vers l'intérieur, et situées symétriquement sur les côtés de la bactérie, à l'emplacement du futur septum. (Ces excroissances qui n'ont pas été signalées chez d'autres bacilles persistent parfois jusqu'au stade 4).

La membrane cytoplasmique épouse tout d'abord la forme de ces protubérances, puis s'invagine pour former le septum.

Il faut donc se représenter dans l'espace la formation du septum comme la fermeture d'un diaphragme et les petites protubérances de la paroi comme un épaississement annulaire.

Pendant ces évènements, on note presque toujours, dans le voisinage immédiat du noyau, la présence d'un mésosome relié au septum de sporulation et qui semble contribuer à la séparation des deux fractions nucléaires.

(Une fois le septum terminé, on trouve souvent un mésosome à cheval sur celui-ci).

Les études de RYTER (coupes en série de 1.000 Å d'épaisseur suivies de reconstitution tridimensionnelle) montrent que les mésosomes interviennent de la façon suivante :

a

Stade 1

b

Stade 2

Stade 3

(d'après RYTER)

Au stade 1, la bactérie ne possède plus que 2 mésosomes, tous deux en contact avec le noyau.

Leur localisation permet de distinguer 2 types :

- dans le type a, les mésosomes sont assez éloignés l'un de l'autre et occupent tous deux une position polaire.

- dans le type b, les 2 mésosomes sont collés l'un contre l'autre. Certaines rares bactéries semblent même ne possèder qu'un seul mésosome volumineux.

Ces types a et b se retrouvent au stade 2 (et ultérieurement au stade 3).

Dans les 2 cas, un des mésosomes polaires du stade 1 participe à la formation du septum de sporulation tout en restant, semble-t-il, en contact avec le noyau de la future spore. Il entrera dans la préspore tandis que l'autre mésosome restera en contact avec le noyau du sporange en conservant sa position initiale.

- A l'autre pôle de la bactérie, on observe très souvent (environ 1 fois sur 2) la présence de petites protubérances pointues de la paroi, analogues et symétriques à celles du septum de sporulation.

La présence d'un mésosome à cet endroit est également très fréquente.

Exceptionnellement, il se forme à cet endroit un 2è septum mais anormal : du matériel dense, analogue à la paroi s'interpose entre les 2 membranes cytoplasmiques. Il n'aboutira pas à la formation d'une préspore.

STADE 3.-

Est caractérisé par la formation de la préspore ovoïde intracytoplasmique.

Elle se manifeste par la déformation du septum de sporulation comme si la partie cytoplasmique sporale s'hypertrophiait.

Le processus exact permettant d'aboutir à cette préspore ovoïde semble être très complexe et prouve une fois de plus la plasticité extraordinaire de la membrane cytoplasmique.

Cette préspore du stade 3 se caractérise par sa forme ovoïde, sa situation intracytoplasmique, et son enveloppe formée de 2 membranes.

Elle contient du cytoplasme de structure comparable à celui du sporange

un mésosome (cf schéma)

et un noyau central plus ou moins découpé.

Ce noyau parait plus volumineux qu'au stade 2, de structure plus lâche, moins colorable.

Parallèlement, durant le passage du stade 2 au stade 3, le noyau du sporange reprend une forme et un volume comparable à ceux d'un noyau normal.

Les différences de colorabilité s'atténuent entre les 2 noyaux.

FORMATION DES ENVELOPPES SPORALES

STADE 4.-

Caractérisé par la formation du cortex.

Elle se manifeste tout d'abord par l'apparition d'une substance dense aux électrons entre les 2 feuillets de membrane cytoplasmique qui limitent la préspore, puis, par celle d'une zone claire située sous la membrane externe.

Deux couches de densité inégale constituent donc le cortex :

- une couche interne dense dont l'épaisseur reste constante par la suite, qui est visible dans la spore mûre (particulièrement après coloration au plomb) et qui formera la paroi bactérienne après germination.

Elle semble donc bien constituée de matériel pariétal ou de son précurseur immédiat, et mérite le nom de paroi sporale (spore wall).

A signaler que ce terme a été utilisé pour désigner la membrane qui lui est sous-jacente et pour laquelle le nom de membrane sporale semble plus justifié.

- une couche externe claire qui s'épaissit aux stades 5 et 6.

STADE 5.-

Caractérisé par l'apparition des tuniques (spore coat).

Lorsque le cortex atteint environ la moitié de son épaisseur finale, les tuniques apparaissent sous forme de 2 couches (chez B. subtilis), constituées chacune de plusieurs lamelles.

Ces tuniques semblent prendre naissance dans le cytoplasme du sporange, à l'extérieur de la membrane sporale externe.

La tunique externe se distingue, dès sa formation, de la tunique interne par sa densité aux électrons.

STADE 6.-

Stade final - Schématisé dans la figure du début, est l'aboutissement de la maturation de la spore qui se fait conjointement à l'apparition des tuniques.

Cette maturation comporte les processus cytologiques suivants :

1.- L'épaississement du cortex et parallèlement la diminution notable de sa densité aux électrons à partir du stade 5.

2.- L'aspect du cytoplasme sporal change du stade 3 au stade 6.

De granulaire et comparable à celui du sporange qu'il était encore au début du stade 3, il devient au fur et à mesure de la formation des enveloppes, de plus en plus diffus et de moins en moins contrasté. Aspect qui atteint son maximum au stade 6.

On peut cependant, par un traitement spécial des coupes (eau oxygénée, coloration à l'acétate de plomb ou d'uranyle) mettre en évidence dans le cytoplasme sporal une structure granulaire bien visible, comparable à celle du cytoplasme du sporange.

3.- Le noyau change lui aussi d'aspect.

Dès l'apparition du cortex (stade 4), il commence à migrer vers la périphérie du cytoplasme sporal et, pendant ce déplacement, le mésosome semble disparaitre.

Au stade 6, on ne retrouve, le long de la membrane sporale que de petites vésicules qui pourraient éventuellement correspondre aux vestiges des mésosomes et le noyau apparait sous l'aspect de plages dépourvues de ribosomes et qui sont en contact direct avec la membrane sporale.

Ces zones marginales nucléaires sont constituées de filaments très fins, visibles surtout après coloration à l'acétate d'uranyle, mais la structure filamenteuse est cependant beaucoup moins caractéristique que celle des cellules végétatives (conditions de fixation modifiées par les enveloppes ou structure particulière ?).

Quant à la membrane sporale externe, elle n'apparait pas clairement sur les coupes. Elle semble se dissoudre, tandis qu'apparaissent les tuniques.

On peut décrire un stade 7 -

celui de spores libres (libérées par lyse du sporange). Vers la 24è heure.

CAS PARTICULIERS -

1.- L'exosporium : il apparait en même temps que les tuniques.

2.- Formation d'inclusions dans les cellules en sporulation (corps parasporaux).

Chez certaines espèces de Bacillus, la sporulation s'accompagne de la formation d'un corps d'inclusion à côté de la spore, dans le cytoplasme du sporange : corps parasporal.
Il peut s'agir d'un corps de substance amorphe ou souvent d'un unique cristal volumineux, bipyramidal, suffisamment grand pour être visible en microscopie optique, mais sa structure est précisée par le microscope électronique.
Ce cristal peut être libéré dans le milieu lors de la lyse du sporange.

La formation de tels cristaux se voient surtout chez les espèces de Bacillus pathogènes pour les insectes (notamment Bacillus thuringiensis).
Ils sont constitués entièrement d'une protéine, synthétisée au cours de la sporulation, et qui se révèle toxique pour les insectes.

On ne sait rien de leur rôle métabolique.
Peut-être jouent-ils un rôle dans le pouvoir pathogène : des mutants ne les produisant pas seraient non pathogènes.

(Ces mêmes mutants sont toujours capables de sporuler : la formation du cristal n'est donc pas une condition indispensable de la sporulation chez ces espèces).

III.- MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES AU COURS DE LA SPORULATION

a.- UNE DESHYDRATATION PROGRESSIVE -

Les spores contiennent en effet, très peu d'eau par rapport à la bactérie végétative, et ceci joue, sans doute un rôle important dans le déterminisme de la grande réfringence des spores et de leur thermorésistance.

b.- DEGRADATION DE RESERVES glucidiques, lipidiques et protéiques.

c.- LE CALCIUM EST PRESENT DANS LES SPORES en quantité beaucoup plus importante que dans la forme végétative, et joue un rôle dans la thermo-résistance : des spores formées dans un milieu dépourvu de calcium sont déficientes et thermo-sensibles.

d.- AU COURS DE LA SPORULATION SONT SYNTHETISEES DIVERSES SUBSTANCES SPECIFIQUEMENT SPORALES,
qui ne le sont pas au cours de la croissance.

- certains antibiotiques : la bacitracine.
- certains antigènes, propres aux spores non retrouvés dans la forme végétative.
- l'acide succinylglutanique ++
- l'acide dipicolinique ++ apparait à T7 (formation des tuniques)

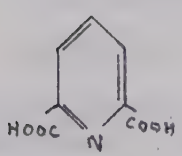
Ce dernier corps parait d'une importance toute particulière, déjà par sa grande abondance dans la spore :

- 5 à 15 % du poids sec.

Cette haute teneur des spores en acide dipicolinique joue un rôle important dans le déterminisme de la thermo-résistance, et ceci conjointement avec le calcium (dipicolinate de calcium).

Le dipicolinate de calcium est responsable de la thermo-résistance sans que l'on sache par quel mécanisme.

En effet,



- l'acide dipicolinique est synthétisé au moment où l'on voit apparaître la thermo-résistance.
- d'autre part, calcium et acide dipicolinique se trouvent dans la spore en quantités à peu près équimoléculaires.

IV.- GERMINATION DES SPORES

Placées dans des conditions de milieu appropriées, les spores germent et donnent naissance à la forme végétative.

Souvent un chauffage de quelques minutes à 60/80° accélère, stimule le déclenchement de la germination.

Le mécanisme de cette activation est inconnu.

On décrit à la germination 2 stades principaux (parfois subdivisés chacun). Mais, on sait en fait assez peu de chose sur la suite des évènements qui se produisent alors.

STADE 1

- Requiert la présence de certains acides aminés, de L-alanine très généralement.
- La spore se réhydrate, augmente de volume, perd sa thermo-résistance, sa réfringence et son imperméabilité aux colorants.
- Au cours de ce stade, il y a excrétion dans le milieu de matériel sporal, et notamment d'acide dipicolinique, de calcium et de peptides.
- Au microscope électronique, on voit :
  - le noyau reprendre une position centrale et sa structure filamenteuse typique ;
  - en même temps, un volumineux mésosome apparaît en connexion avec le noyau d'une part, et avec la membrane sporale d'autre part.
  - il y a formation importante de ribosomes.
- Au total, il est évident que cette période correspond à une intense activité métabolique et notamment de synthèse d'enzymes.
- Durée : 1 heure environ.

STADE II -

- On voit alors les tuniques se rompre (soit à un pôle, soit dans la région médiane) et une jeune cellule végétative en énerge (stade d'énergence).

- Cette cellule s'allonge (stade d'élongation) pour donner une forme bacillaire normale.

- Puis survient la première division cellulaire.

DEUXIEME PARTIE

FORMES L

MYCOPLASMES

RICKETTSIES

MIYAGAWANELLES

SPIROCHAETALES

ACTINOMYCÈTES

INTRODUCTION

Nous venons d'étudier la cytologie d'une cellule baotérienne typique. Nous envisagerons, dans cette seconde partie, les différentes bactéries dont la position taxonomique a donné lieu à de nombreuses discussions. Ces dernières étaient dues aux analogies qui existent avec d'autres groupes de microorganismes.

Mais dans chaque cas nous nous efforcerons de démontrer que l'étude de leur structure intime a permis de les classer dans le monde bactérien.

FORMES L

Certaines espèces bactériennes, dites polymorphes, donnent spontanément naissance à des formes bizarres, anormales, souvent globuleuses, semblables aux protoplastes dans leur morphologie et leurs propriétés.

Sur des milieux au sérum, les colonies formées restent très petites et ont un aspect particulier (colonies L) très semblables à celui des colonies de protoplastes.

- C'est ce que découvrit en 1935 Mme KLIENEBERGER-NOBEL dans des cultures de Streptobacillus monoliformis (à une époque où l'on ne connaissait pas les protoplastes).

  Elle observa en effet dans des cultures de ce germe des formes arrondies, globuleuses, différentes de la bactérie normale.

  Elle remarqua que sa souche donnait aussi naissance à deux types de colonies : des colonies "normales" où elle retrouvait formes globuleuses et streptobacillus normal, et de petites colonies faites uniquement de formes globuleuses.

  Elle réussit à isoler ces formes globuleuses en culture pure.

  Cet organisme ressemblait tellement par sa morphologie et celle de ses colonies aux organismes du groupe de la péripneumonie des bovidés qu'elle crût qu'il s'agissait d'un organisme de ce groupe vivant en symbiose avec le streptobacille.

  Elle le désigna sous le nom de forme L (de Lister Institute où elle travaillait)

Mais peu de temps après d'autres auteurs, et notamment DIENES, montrèrent qu'il ne s'agissait pas du tout d'une contamination, mais que ces formes globuleuses étaient parfaitement dérivées de la forme bacillaire normale.

STREPTOBACILLUS MONILIFORMIS est le type même de bactérie donnant spontanément de telles formes globuleuses.

Il en est de même de Sphaerophorus funduliformis et de quelques autres bactéries.

Cette découverte serait donc restée d'intérêt limité si, quelques années plus tard, on n'avait découvert que chez de nombreuses autres bactéries, habituellement non polymorphes, on pouvait isoler " des formes L" plus ou moins stables, grâce à certains artifices de culture, à certains agents "inducteurs" ajoutés au milieu de culture :

- complexe anticorps-complément (expérience faite avec Salmonella typhi et Proteus)
- addition de sérum normal (surtout sérum bovin).
- addition d'acides aminés (glycocolle à fortes concentrations - méthionine - phénylalanine).
- de hautes concentrations de sel.
- le froid, les Rayons X.
- et surtout la Pénicilline.

Les formes L se sont révélées en effet, insensibles à l'action de cet antibiotique qui favorise leur apparition et les sélectionne.

Les formes L obtenues grâce à ces agents sont :

- tantôt instables : formes L de type B

  c'est-à-dire que lorsque l'agent inducteur est supprimé, on voit réapparaitre, à partir de ces formes L, des formes bactériennes normales.

- tantôt stables - fixées : formes L de type A

C'est-à-dire que la levée de l'agent inducteur n'entraine pas la réversion.

En général, après les premiers passages sur milieu inducteur, les cultures obtenues réversent (encore que, selon TULASNE, on peut dès ces premiers passages obtenir déjà des colonies de formes stables).

De toute façon, après un certain nombre de passages successifs, sur les milieux appropriés, on peut supprimer l'agent inducteur : l'état L persiste.

On a pu obtenir ainsi des formes L à partir d'un grand nombre d'espèces bactériennes.

Gram positif	Streptocoques - Staphylocoques Bacillus - Corynébactéries - Clostridium
Gram négatif	Gonocoques Streptobacillus moniliformis Funduliformis Proteus Salmonelles - Shigelles Colibacilles - Klebsielles Hémophiles Vibrion cholérique etc....

Les plus étudiées sont les formes L de proteus.

ETUDE MORPHOLOGIQUE

des formes L et de leurs cultures.

1.- CETTE ETUDE NECESSITE DES TECHNIQUES SPECIALES

en raison de la fragilité des éléments : séchage, fixation habituelle des préparations les détruisent.

Pour préserver leur structure, on fait des préparations de colonies entières.

- La méthode de DIENES consiste à découper un carré de gélose couvert de colonies, à le déposer sur une lame, et à le recouvrir d'une lamelle sur laquelle on aura pu faire sécher une goutte de colorant (bleu de méthylène par exemple).

- La méthode de TULASNE consiste, après un prélèvement fait comme précédemment, à examiner les colonies en contraste de phase. Il faut que la gélose soit très transparente.

- On peut encore (KLIENEBERGER-NOBEL) faire des cultures sur lamelles, fixer au Bouin, colorer au Giemsa, puis, monter sur lame dans l'eau ou le baume de Canada après déshydratation.

II.- RESULTATS :

1.- Fait très remarquable :

Les microorganismes L ont toujours le même aspect, dans leurs colonies comme dans leurs constituants, quel que soit le germe dont ils sont issus.

2.- Les formes L fixées

vraies formes L selon KLIENEBERGER-NOBEL,
formes L de type A (DIENES - TULASNE).

- forment des colonies très petites

  - de 20 à 500 μ au maximum de diamètre. (certaines ne sont donc visibles qu'à la loupe),

  - rondes

  - leur centre est dense et opaque ;

  - il est entouré d'une aréole transparente, au contour finement dentelé : aspect en oeuf sur le plat

  Ces colonies sont incrustées dans le milieu au niveau de leur centre : la croissance se fait dans la profondeur du milieu : aspect comparable à des colonies de Mycoplasmes.

- ces colonies sont constituées d'éléments arrondis

  de taille très variée : allant de celle d'un coque (petit) à celle d'un leucocyte : corps globuleux.

  Les plus volumineux ont un aspect granuleux et vacuolaire.

  On voit aussi, dans ces colonies L, de petits granules de 200 m μ environ, qui résulteraient de l'éclatement des corps globuleux (corpuscules élémentaires.

3.- LES FORMES INSTABLES REVERSIBLES

formes L de type B (DIENES - TULASNE)

- ont des colonies plus grosses , mais d'aspect analogue
- qui sont constituées essentiellement d'éléments globuleux assez volumineux, que l'on voit d'ailleurs prendre naissance aux dépens de formes bactériennes normales.

  La bactérie présente une hernie à une extrémité ou en son milieu. Le contenu bactérien parait en quelque sorte faire issue à travers un trou de la paroi. Puis, l'élément ainsi libéré gonfle.

D I V I S I O N

L'étude du mode de division des formes L et les hypothèses émises à son sujet ont fait couler beaucoup d'encre. On a écrit beaucoup d'erreurs.

Ces études ont été un des grands sujets d'intérêt des formes L, car on avait cru découvrir dans les formes L un mode de multiplication particulier des bactéries jusque là inconnu.

On avait en effet imaginé un véritable "cycle L" qui aurait été le suivant :

- Transformation de la bactérie normale en un petit organisme arrondi de 4 à 5 μ de diamètre (forme intermédiaire) avec un noyau homogène de 3 à 4 μ.

- Augmentation de volume de cette forme intermédiaire jusqu'à un diamètre de 15 à 25 μ (forme géante), dont la substance nucléaire se fragmente et forme de nombreuses granulations, dont les plus grosses ont 0,2 μ de diamètre.

- Cette forme géante, en éclatant, libèrerait ces granules qui constituent les formes naines ou corpuscules élémentaires.

- Ces granules seraient viables et redonneraient des formes globuleuses, lesquelles, dans le cas de formes L réversibles, redonnent la bactérie.

Dans cette hypothèse, le granule apparait donc, à la fois comme une forme de reproduction et comme un processus de multiplication intense puisqu'une forme globuleuse libère un nombre élevé de granules : il est certain qu'un tel mode de reproduction n'est pas connu chez les bactéries.

Cette théorie était basée sur deux faits principaux :

1.- Les constatations des examens microscopiques où l'on voit de tels granules (cf. plus haut).

2.- Des expériences de filtration :
Les formes L traversent les filtres bactériens usuels.

En fait, cette théorie est actuellement abandonnée :

- Il a été prouvé, par micromanipulation, que les corpuscules élémentaires ne sont pas viables : ce ne sont que des produits non viables (peut-être organisés cependant ?) de la lyse d'une partie des corps globuleux.

- La filtrabilité des cultures L est dûe tout simplement au passage à travers les filtres des plus petites formes globuleuses, grâce à leur plasticité.

Actuellement, on envisage de façon beaucoup plus simple la multiplication des formes L.

Elle se fait par division directe.

Les divisions donnent naissance en général à des corps globuleux-fils de volume à peu près équivalent.

Elles se produisent dans le fond du cratère creusé dans la gélose par le fond de la colonie.

Les éléments nouvellement formés sont expulsés en surface où ils s'étalent et forment l'auréole translucide à la périphérie de la colonie.

Lorsqu'un corps globuleux, au lieu de se diviser, éclate en libèrant des granules, il se détruit en tant que cellule organisée et viable. Ceci ne signifie pas d'ailleurs que l'étude de ces granules ne présente aucun intérêt : peut-être sont-ils organisés et formés aux dépens de la membrane.

PROPRIETÉS DES FORMES L

I.- Conditions de Culture

Outre, les agents sélecteurs vus plus haut, les formes L

- préfèrent les milieux gélosés aux milieux liquides ; mais milieux faiblement gélosés, demi mous et humides.

- peuvent cultiver néanmoins en milieux liquides, où elles donnent une culture d'aspect granuleux.
  Certaines peuvent donner un faible voile en surface.

- Les formes L fixées exigent du sérum (20 % de sérum de cheval) (peut-être pas toutes).

- Les exigences quant aux conditions osmotiques sont variables.

  - certaines formes L exigent des milieux nettement hypertoniques : hautes concentrations en sel ou en saccharose.

  - d'autres, sont plus tolérantes et se multiplient sur milieux isotoniques (Streptobacillus moniliformis)

  Ceci tient sans doute à des différences de fragilité de l'enveloppe.

II.- Constitution Chimique

La constitution chimique

- Présenterait quelques différences avec celle de la forme bactérienne, mais plus d'un point de vue quantitatif que qualitatif :

  - davantage de lipides dans la forme L (TULASNE)
  - le rapport $\frac{ADN}{ARN}$ serait plus élevé dans la forme L
  - mais le DNA a la même composition en bases.

Il est même l'homologue du DNA bactérien, comme l'a prouvé la réalisation de molécules hybrides.

- Surtout : on ne met en évidence pas ou peu des constituants de la paroi, et en particulier du mucopeptide

III.- SÉROLOGIE

Les études sérologiques montrent qu'il existe des relations antigéniques étroites entre forme L et bactérie d'origine.

La forme L peut toutefois avoir des antigènes en moins par rapport à la bactérie.

- Antigène H si la forme L n'a pas de flagelles ;
- mais d'autres aussi probablement, comme le montrent des expériences d'absorption d'antisérums par bactérie normale ou sa forme L :

Un sérum anti-forme bacillaire perd toutes ses agglutinines après absorption par la forme bacillaire. Mais, après absorption par forme L, il reste capable d'agglutiner la forme bacillaire.

IV.- MÉTABOLISME

Les propriétés métaboliques des formes L sont en général très comparables à celles de la bactérie d'origine :

- anaérobie strict si la bactérie l'est
- aéro-anaérobie si la bactérie l'est, comme le montre l'expérience
- des fermentations sucrées identiques de KANDLER et MINCK sur Pr. vulgaris).

Toutefois, certainement variations possibles.

V.- POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

Le pouvoir pathogène expérimental des formes L fixées est sans doute très réduit.

- KLIENEBERGER-NOBEL ne parvient pas à infecter la souris avec Streptobacillus moniliformis. (elle y parvient avec une forme de transition).

- Très généralement, l'injection de doses importantes de formes L aux animaux de laboratoire ne peoduit aucun phénomène pathologique et les microorganismes disparaissent très vite après l'injection.

- Toutefois, l'inoculation sous-cutanée ou intradermique a permis à MINCK, à FRUHLING, d'obtenir des abcès locaux.

- MINCK a pu créer aussi une péritonite mortelle chez la souris avec une forme L de Vibrion .

- TULASNE et LAVILLAUREIX ont pu tuer aussi des souris avec des formes L tuées de Vibrions des Eaux, mettant là on évidence le rôle d'une endotoxine.

Donc, dans l'appréciation du pouvoir pathogène expérimental, il faut faire la part de ce qui peut revenir à une forme de transition, mais il faut probablement aussi nuancer les premières impressions qui avaient été de déclarer les formes L non pathogènes.

VI.- ANTIBIOTIQUES

Les formes L sont insensibles à la Pénicilline et aux Sulfamides.

Elles peuvent être inhibées par d'autres antibiotiques.

VII.- SENSIBILITÉ AUX BACTÉRIOPHAGES

1.- D'après un certain nombre de travaux et notamment une publication récente de TULASNE :

- Les formes L de type A (fixées) résistent aux phages qu'elles sont incapables de fixer.
  Les récepteurs phagiques sont donc éliminés.

- Les formes L de type B (réversibles) présentent une sensibilité variable.

  Au début de la transformation, elles sont aussi sensibles que la bactérie d'origine, puis, au fur et à mesure que la transformation se poursuit, la sensibilité diminue pour disparaitre. Autrement dit, les récepteurs phagiques sont peu à peu détruits.

2.- Ces travaux concluent d'autre part à la persistance du caractère lysogène chez les bactéries dont on transforme la forme normale en forme L, aussi bien A que B.

QUE SONT EN DEFINITIVE LES FORMES L ?

1.- DÉFINITION

On peut en donner une définition plus ou moins restrictive.

- Mme KLIENEBERGER-NOBEL : définition restrictive ne reconnaissant comme vraie forme L que la forme stable, et elle rappelle que la désignation "forme L" a été utilisée initialement pour décrire un type de croissance et non des éléments isolés.

Elle s'oppose donc à ce que ce terme soit employé pour désigner n'importe quelle forme aberrante de culture bactérienne.

Sa définition est la suivante :

> "Le terme de forme L s'applique à une forme de culture bactérienne stable qui est faite d'éléments protoplasmiques nous, sans morphologie définie, qui ne présente plus de formes bactériennes rigides et ne réverse plus vers elles, qui peut être propagée indéfiniment et qui a, sur milieu solide, des colonies caractéristiques indépendantes de l'espèce bactérienne dont la culture est dérivée".

Cette définition a été agréée par une Réunion Internationale (en 1958).

- Certaines définitions sont moins rigoureuses, en ce sens qu'elles incluent les formes de transition réversibles.

- De toute façon, il faut pour parler de forme L, associer

  - la morphologie des éléments
  - la possibilité de culture de colonie L sur milieux solides.

II.- SIGNIFICATION

Quelle que soit la définition précise adoptée, il est évident et unanimement admis que les formes L

- ne sont pas un mode particulier de reproduction bactérienne
- mais que ce sont des bactéries à paroi déficiente que seules des conditions de culture particulières sauvent de la lyse.

Ce sont des sphéroplastes, des "protoplastes" au sens large.

Les images de microscopie électronique montrent effectivement l'absence de paroi, que toutes les propriété vues plus haut suggèrent.

Les formes réversibles s nt des sphéroplastes phénotypiques. Il est tentant d'assimiler les formes L fixées à des sphéroplastes génotypiques.

Cependant, toutes les formes L fixées n'auraient pas une origine mutationnelle et la raison de l'absence de réversion n'est pas claire (cf. Protoplastes).

L'INTERET ACTUEL

réside dans le rapport avec les mycoplasmes que nous verrons plus loin et le rôle pathogène éventuel chez l'homme, question très discutée.

Il est double
- Rapport avec Mycoplasmes.
- Rôle pathogène éventuel chez l'homme

MYCOPLASMES

En 1898, NOCARD et ROUX cultivent pour la première fois l'agent de la péripneumonie des bovidés. Il s'agit d'un micro-organisme filtrable dont la taille est d'environ 150 m μ
Il s'agit de Mycoplasma mycoïdes qui, longtemps, a été considéré comme un virus.

En fait, les mycoplasmes sont de très petites bactéries dépourvues de paroi rigide ; elles sont d'une extrême plasticité et ne sont limitées que par une membrane simple.

On a pu étudier la morphologie des mycoplasmes soit par microscopie en contraste de phase, soit par coloration de Machiavello, de Giemsa et surtout de Dienes.

La colonie prélevée apparait comme un feutrage de filaments, de corps globulaires et de granules.
C'est en raison de ce polymorphisme que le groupe porte le nom de mycoplasme.
La microscopie électronique nous permet d'avoir une idée bien plus précise.

Les mycoplasmes sont limités par une membrane cytoplasmique de 110 Å d'épaisseur, constituée de 3 couches : 2 extrêmes opaques aux électrons, une couche moyenne de densité moindre.

Le cytoplasme est dense et contient des ribosomes dont le diamètre est de 140 Å de la périphérie de la cellule ; les cellules les plus petites sont entièrement remplies par ce matériel dense, les plus grandes ont une partie centrale relativement claire.

Dans cette dernière zone, on reconnait des fibrilles de 30 Å de diamètre qui rappellent étrangement les mêmes fibres de DNA des eubactéries. Ce matériel nucléaire, démontré comme tel, n'est séparé d'un cytoplasme par aucune membrane.

Un travail récent de BODE et MOROWITZ (1967) a démontré chez Mycoplasma hominis H39, la présence d'un unique chromosome ; que ce chromosome est une double hélice de DNA circulaire, non ramifiée et que la réplication de ce chromosome se fait sur le même mode que celle d'E. coli.

En définitive, cette structure des mycoplasmes est la même que celle d'une eubactérie si ce n'était l'absence d'une paroi rigide.
Mais cette structure a permis à certains auteurs de ne pas différencier les mycoplasmes des formes L devant les points communs suivants :

- l'absence de paroi,
- le même aspect des colonies,
- la même résistance à la pénicilline.

Les mycoplasmes seraient, de ce fait, des formes L d'espèces bactériennes non identifiées. Dans ce cas, le maintien du genre mycoplasma ne serait pas justifié.

Mais, il y a entre formes L et mycoplasma un certain nombre de différences qui empêchent de souscrire sans réserve à cette opinion.

1.- Bien qu'obtenues sur des milieux enrichis, de pH alcalin, additionné de pénicilline les formes L n'ont pas le besoin en cholestérol des mycoplasmes parasites qui l'incorporent dans leur membrane ; leur métabolisme est donc différent.

2.- Les formes L sont très fragiles, rompues par l'eau distillée, beaucoup plus que les mycoplasmes.

3.- Les formes L conservent les caractères de la bactérie d'origine :

- même activité biochimique
- même antigène somatique
- et surtout un DNA identique avec un même rapport (ou alors $\frac{G + C}{A + T}$ identique)

Alors qu'on ne retrouve aucune parenté antigénique entre mycoplasme et bactéries, les mycoplasmes ont une DNA dont le rapport $\frac{G + T}{A + T}$ est plus faible que dans tout autre microorganisme.

4.- En fait, aucune forme intermédiaire entre un mycoplasme et une bactérie n'a été observée et c'est peut-être là le critère le plus simple et le plus valable.

Dans ces conditions, la position taxonomique du groupe pose un problème non résolu.

RICKETTSIES

Les Rickettsies ont été très longtemps classées dans une position frontière et considérées comme des formes intermédiaires entre bactéries et virus, en raison de leur petite taille et surtout de leur parasitisme obligatoire et de l'impossibilité de cultiver en milieux artificiels.

En fait, nos connaissances actuelles sur la structure des virus d'une part et celle des bactéries d'autre part, montre qu'il n'existe pas de formes de transition entre bactéries et virus. Selon, la définition qu'en a donnée LWOFF, la particule virale ou virion possède un seul acide nucléique, est incapable de croitre et de se diviser, est uniquement reproduit à partir de son matériel génétique, est dépourvu de métabolisme, doit recourir aux systèmes enzymatiques préexistant dans la cellule hôte.

Les rickettsies n'ont aucune de ces propriétés, au contraire, les études tant cytologiques que biochimiques montrent qu'elles ont une structure tout à fait de type bactérien.

On décrit chez toutes les Rickettsies une paroi, une membrane cytoplasmique, des ribosomes cytoplasmiques et des fibres de DNA.

Il est décrit une tunique externe qui présente trois couches (2 opaques séparées par une plus claire). Des travaux plus précis (ANACKER, PICKENS et LACKMAN) ont démontré l'existence de 5 couches :
trois couches opaques, une externe et deux internes, ces 2 dernières séparées par une très fine couche claire.
Cette tunique externe est la paroi que l'on voit souvent ridée.

Par ailleurs, WOOD Jr et WISSEMAN Jr ont démontré chez R. mooseri la présence dans la paroi de l'acide diaminopimélique et d'acide acétyl muramique.

Ces auteurs rappellent les similitudes avec les eubactéries gram négatives :
leur réaction négative à la coloration de Gram
la présence de plus de 4 ou 5 acides aminés dans la paroi.
l'inoculation de rickettsies ou de leur paroi à des animaux donne des réponses identiques à celles produites par l'endotoxine d'E. coli.
l'absence d'acides techoïques permet d'écarter les bactéries gram positives.

A l'extérieur de cette paroi, il a été observé la présence d'une couche de consistance amorphe sans limites nettes que l'on pourrait considérer comme une capsule. Certains y situent l'antigène soluble.

- La membrane cytoplasmique présente une structure à trois couches (deux couches opaques séparées par une couche claire). Cette membrane est parfois invaginée formant de petites poches intra cytoplasmiques.

- au sein du cytoplasme on note la présence de granules rappelant les ribosomes dispersés dans une substance de base de densité moyenne.

- Il a été décrit de fines fibrilles de DNA situées dans des zones à l'intérieur de cette substance de base, mais de vraies plages nucléaires n'ont jamais été observées.

Les Rickettsies sont sans discussion des organismes unicellulaires de type bactérien. Elles se multiplient par scission binaire ; elles contiennent à la fois des acides ribo- et desoxy-ribo-nucléiques ; elles possèdent un équipement enzymatique considérable ; leur cellule est entourée d'une paroi contenant le mucocomplexe. Elles sont sensibles à l'action des antibiotiques.
Toutes ces propriétés les distinguent nettement des virus.

MIYAGAWANELLES

Comme les Rickettsies, les Miyagawanelles ont été longtemps considérées à la frontière entre bactéries et virus.

Elles se présentent comme des granulo corpuscules de 250 à 400 mμ ayant une grande affinité pour les colorants basiques ce qui leur a valu pour certains auteurs, le nom de "virus basophiles"

La microscopie électronique a permis d'étudier les différentes formes des agents de ce groupe et de reconnaitre de nombreux éléments propres aux bactéries.

Au niveau des corps initiaux dont la taille est de 400 à 500mμ, on note un aspect réticulaire limité par une membrane formée de 3 couches qui s'apparente à la paroi avec immédiatement à l'intérieur une seconde membrane mal définie.
L'aspect réticulaire de l'intérieur est donné par un mélange de fibres probablement de DNA et de granules de 100 à 130 Å de diamètre (probablement ribosomes).

Au niveau des corps élémentaires, on retrouve les mêmes structures, on note à l'intérieur la présence de systèmes membraneux internes ressemblant à une empreinte digitale et rappelant les mésosomes.

Il a été démontré la présence d'acide acétyl muramique ce qui signe l'existence même d'une paroi.

Tous ces éléments cytologiques joints à la division binaire, à la présence des deux acides nucléiques et aussi à la sensibilité à l'action des antibiotiques permettent de classer les Miyagawanelles dans le monde bactérien.

SPIROCHAETALES

La position des Spirochaetales au sein des protistes a fait l'objet jusqu'à une date très récente de nombreuses controverses.

Certains considéraient les Spirochaetales comme des bactéries, d'autres comme des protozoaires; enfin, d'autres les classaient dans une catégorie intermédiaire entre les deux : les Protozoobacteria.

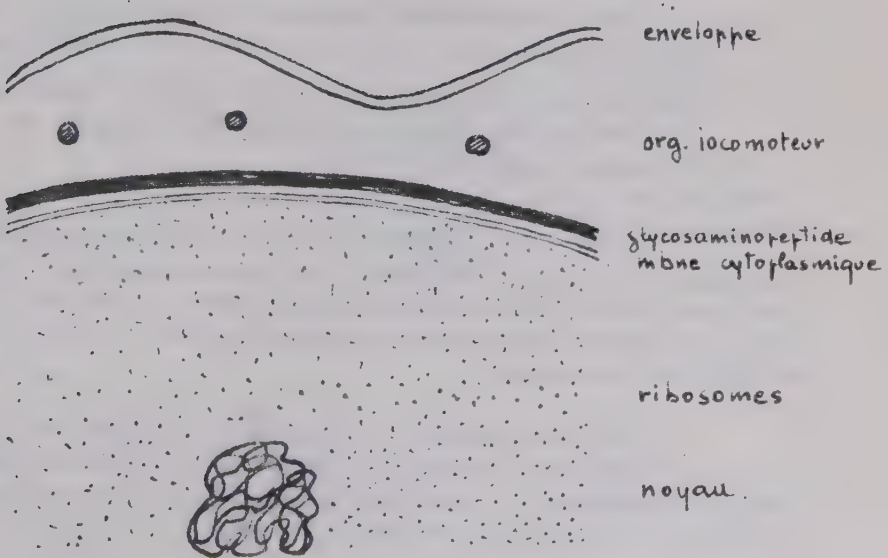
Les travaux récents de PILLOT ont permis d'éclaircir les relations qui unissent les Spirochaetales aux protistes et aboutissent à la conclusion que les Spirochaetales sont des bactéries.

I.- SITUATION DES SPIROCHAETALES AU SEIN DES PROTISTES

Les Spirochaetales sont des procaryotes.

En effet :

- le matériel nucléaire n'est pas inclus dans une membrane,
- les Spirochaetales possèdent des mésosomes qui remplissent chez les bactéries les positions biochimiques normalement dévolues aux mitochondries ,
- l'élément fondamental de l'appareil locomoteur (axostyle) ne se décompose pas en sous-unités, la structure est comparable à celle observée chez les spirilles.
- les tréponèmes, borrelia et leptospires, contiennent le glycosaminopeptide qui assure la rigidité de la paroi et qui n'est présent que chez les procaryotes.



2.- DETERMINATION DES CARACTERES PROPRES DES SPIROCHAETALES

Les Spirochaetales sont constituées par :

- une enveloppe externe souple, élastique et fragile,
- un corps cellulaire de disposition hélicoïdale constituée d'un cytoplasme et contenant les vacuoles et le noyau.
- une membrane limitant le corps cellulaire, possédant à la fois les caractères d'une paroi (glycosaminopeptide) et d'une membrane cytoplasmique (mésosomes) de bactérie dénommée "membrane périéto-cytoplasmique".
- un organe locomoteur interne situé dans l'espace limité extérieurement par l'enveloppe et intérieurement par la membrane pariéto-cytoplasmique.

A.- L'ENVELOPPE

1.- Elle est différente de la capsule des eubactéries. L'enveloppe est souple, élastique et nettement délimitée tandis que la capsule est dénuée de plasticité et souvent mal délimitée.

Sa complexité chimique (lipides, oses, protéines) la différencie de la capsule bactérienne qui est constituée presque exclusivement de polyosides ou de polyeptiques.

2.- L'enveloppe présente au microscope électronique une certaine analogie avec la paroi des eubactéries Gram négatif.

L'une et l'autre sont constituées de trois feuillets, le feuillet médian étant moins dense aux électrons que les feuillets externe et interne.

Cependant, enveloppe et paroi ont des propriétés différentes : l'enveloppe est douée d'une grande plasticité alors que la paroi est rigide. Chez les eubactéries, la rigidité de la paroi est assurée par le glucosaminopeptide qui est absent de l'enveloppe des tréponèmes.

Par un traitement au nitrate de lanthane ou l'acétate d'uranyle (MURRAY, DE PETRIS), ces auteurs ont mis en évidence chez les eubactéries à Gram négatif l'existence d'un feuillet situé entre la membrane cytoplasmique et la paroi.

Ce feuillet contient le glucosaminopeptide. En effet, chez les sphéroplastes, ce feuillet a disparu. Chez les Moraxella, les Vitreoscilla et les spirilles, la paroi classiquement visible se dissocie du feuillet rigide. Chez ces bactéries, il existe une moins grande adhérence au feuillet glucosaminopeptidique que chez E. coli.

Considérant que la paroi des bactéries Gram négatif, dans le sens physiologique du terme, est constituée d'une part de trois feuillets externes relativement souples, visibles en microscopie électronique classique, d'autre part, d'un feuillet interne rigide adhérent ou non au précédent.

Ainsi, on peut assimiler l'enveloppe des Spirochaetales aux trois feuillets les plus externes de la paroi des eubacté - ries Gram négatif correspondant à la partie la plus souple de la paroi.

En effet, la composition chimique de l'enveloppe des Spirochaetales et de la paroi des eubactéries à Gram négatif est semblable : lipides, oses et protéines. Ce qui les distingue bien de la paroi des eubactéries à Gram positif.

B.- LA MEMBRANE PARIETO-CYTOPLASMIQUE

1.- La membrane limitant le cytoplasme est pariétale dans le sens physique et chimique du terme, puisque nous retrouvons le glycosaminopeptide.
Constamment associé au corps cellulaire, le glyco - saminopeptide assure au corps cellulaire sa forme cylindrique et sa disposition hélicoïdale sans lui conférer de rigidité absolue.

Le glycosaminopeptide de T. reiteri est insensible au lysozyme, même en présence de versène ; cette insensibilité de certains glycosaminopeptides au lysozyme est due à un type de liaison autre que (1 - 4) entre l'acide N-acétyl muramique et la N-acétyl glucosamine ou bien à l'acétylation des fonctions hydroxyles de l'acide.

2.- La membrane est cytoplasmique par sa position limitante du cytoplasme, au sein duquel elle constitue les mésosomes par ses nombreux replis.
Elle est insensible aux tensio-actifs et à l'eau saturée de butanol. Il est possible que cette stabilité lui soit assurée.

C.- L'APPAREIL LOCOMOTEUR

Sa localisation entre l'enveloppe et la membrane parieto-cytoplasmique est très caractéristique des Spirochaetales.

L'organe locomoteur s'insère aux deux extrémités de la cellule par l'intermédiaire de granules analogues à ceux que l'on décrit à la base des flagelles bactériens.
Cependant, les connaissances ne sont pas encore complètes et plusieurs problèmes ne sont pas résolus.

Y-a-t-il continuité de la fibrille ou de l'axostyle d'une extrémité à l'autre avec insertion à chaque extrémité ?

L'organe locomoteur n'est-il inséré qu'à une seule extrémité ? Cette conception expliquerait les variations du nombre des fibrilles que l'on observe dans une même cellule et d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce.

Dans le genre Leptospira, l'appareil locomoteur est constitué d'une unique élément rectiligne ou curviligne : l'axostyle. Le corps cellulaire est enroulé en hélice autour de l'axostyle.
Dans les genres Treponema et Borrelia, l'organe locomoteur est constitué de 3 à 15 fibrilles, peut-être davantage.

Le faisceau de fibrilles est enroulé en hélice autour du corps cellulaire. Fibrilles et corps cellulaire tournent selon un même pas de vis mais en sens contraire. Dans le genre Critispira, le nombre des fibrilles atteint plusieurs centaines, mais leur disposition est la même que dans les genres Treponema et Borrelia.

Si le nombre des fibrilles croît proportionnellement au diamètre du corps cellulaire, le diamètre de la fibrille demeure constant.

On peut préciser la définition des Spirochaetales :

" Ce sont des bactéries hélicoïdales, flexibles et mobiles grâce à un appareil locomoteur interne situé entre une enveloppe externe souple et une membrane pariéto-cytoplasmique plus rigide. "

PILLOT propose par ailleurs de grouper les Spirochaetales, genres Treponema, Borrelia et Cristispira dans une famille unique : les Treponemataceae ; et de créer pour le genre Leptospira une famille nouvelle : les Leptospiraceae.

ACTINOMYCÈTES

Les Actinomycètes ont été longtemps classées avec les champignons et ne sont rattachées aux bactéries que depuis quelques années.

Les Actinomycètes sont des bactéries filamenteuses et ramifiées gram positives, de sorte qu'ils se présentent sous forme d'un mycelium.
Le développement de ce mycelium est toutefois d'importance variable selon les espèces.

Dans les espèces que l'on peut qualifier de plus primitives la croissance se fait sous forme mycélienne, mais en fin de croissance le mycelium se fragmente en courts bacilles, voire en éléments coccoïdes, indistinguables en apparence d'une bactérie unicellulaire.
C'est le cas des Actinomycètes et des Nocardia.

Le développement du mycélium est à son maximum dans les formes les plus évoluées : Streptomyces, Micromonospora, Actinoplasmes.
Il constitue ici une structure permanente qui ne se fragmente pas et qui, pour certains de ces germes, se différencie en :

- un mycelium de base, rampant à la surface des milieux et pénétrant dans les milieux ;

- des filaments aériens, fins, qui donnent à la colonie un aspect duveteux.

La reproduction ne se fait plus ici par fragmentation mais par formation, sur certains filaments de cellules arrondies isolées, par 2 ou en chaines : les spores (conidies).

La ressemblance avec les champignons est grande.

Un autre élément de confusion vient de l'aspect des lésions que les espèces pathogènes provoquent chez l'homme et chez les animaux. Ce sont des lésions subaigues ou chroniques suppurées dans lesquelles on trouve ce pus d'aspect assez particulier par le fait qu'on y observe des granules, formées par l'amas de filaments assez souvent entourés d'éléments renflés en massues.

De plus, certaines maladies, comme les mycétomes peuvent avoir, une origine soit actinomycosique soit mycosique vraie.
On conçoit donc la confusion faite entre Actinomycètes et champignons.

Mais pourquoi les actinomycètes ne sont-ils pas des champignons ?
Le développement de nos connaissances en biochimie et en structure cellulaire ne laisse plus aucun doute : ce sont des bactéries :

1.- Le diamètre des filaments est de l'ordre du diamètre habituel des bactéries et inférieur à celui des champignons ($\leqslant 1\mu$)

2.- Les conditions de culture facilitant le développement des champignons ne sont pas favorables aux Actinomycètes ; on les cultive volontiers sur gélose de Sabouraud, mais à pH neutre et non acide.
De plus, il existe des Actinomycètes anaérobies strict.

3.- Les actinomycètes sont sensibles à certains antibiotiques antibactériens (actifs sur gram positif) alors qu'ils sont insensibles aux antifungiques (en particulier aux polyènes : probablement parce qu'ils manquent de stérols comme les autres bactéries).

4.- La structure cytologique est celle des bactéries ; ce sont des procaryotes dont le noyau n'est pas entouré d'une membrane.
Les flagelles lorsqu'ils existent sont de type bactérien.

5.- Critère biochimique :

la paroi qui entoure les cellules d'Actinomycètes a une composition clinique comparable à celle des bactéries gram positif.
Les Actinomycètes sont d'ailleurs gram positif.
Le squelette rigide de cette paroi ne contient ni chitine ni cellulose mais on y retrouve au contraire,

- glucosamine
- acide muramique
- alanine, glycocolle, acide glutanique, acide diaminopilémique ou lysine qui sont les constituants de la paroi des bactéries.

6.- Les Actinomycètes, comme les bactéries, sont sensibles à certains bactériophages semblables à ceux des bactéries (Actinophages).
La lysogènie existe chez les Actinomycètes.

Tous ces arguments réunis permettent de classer les Actinomycètes avec les bactéries.

CONCLUSIONS

Après avoir exposé dans une première partie les caractères structuraux d'une cellule bactérienne typique, d'une Eubactérie, nous avons, dans la deuxième partie de notre travail, successivement étudié les différents groupes de microorganismes dont la position taxonomique était jusqu'ici incertaine. Pour chacun d'entre eux, nous avons exposé les arguments essentiellement d'ordre cytologique qui justifient leur rattachement aux Bactéries.

La connaissance approfondie que nous avons aujourd'hui de la structure de la cellule bactérienne, à la lumière des travaux modernes, permet, en effet, une définition précise du monde bactérien et de ses limites.

Il est ainsi maintenant établi que, d'une part la frontière Bactéries-Virus est absolument nette : il n'existe pas de formes intermédiaires, de transition entre les bactéries et les virus.

Les Bactéries sont des êtres de structure cellulaire ; elles sont donc très différentes des virus, dont la définition repose sur les caractères suivants étudiés par LWOFF :

- Le Virion, certes, possède une structure définie (cubique - hélicoïdale - ou binaire), mais cette structure n'a rien qui ressemble à l'organisation d'une cellule.
- Il ne possède qu'un seul acide nucléique.
- Il est incapable de croître et de se diviser ; il est reproduit uniquement à partir de son matériel génétique.
- Le Virion est dépourvu de métabolisme : il ne possède pas les systèmes enzymatiques nécessaires à la synthèse de ses constituants à partir des éléments simples du milieu.

- Il doit recourir aux systèmes enzymatiques préexistant dans la cellule-hôte, dont il utilise aussi les ribosomes et les A R N de transfert = les virus sont des parasites absolus.

Il apparaît ainsi que seule l'insuffisance de nos moyens d'investigation est responsable de nos difficultés antérieures : Rickettsies et Miyagawanelles ne sont pas des virus mais des bactéries authentiques.

La distinction peut être parfois plus délicate entre Bactéries et Protistes eucaryotes, devient claire cependant au fur et à mesure que progressent les recherches. Elle se fonde, dans l'état actuel de nos connaissances, sur les éléments fondamentaux suivants que l'on peut ainsi résumer :

	BACTERIES	CELLULES EUCARYOTES
. N O Y A U	. Matériel nucléaire non limité par une membrane	. Noyau limité par une membrane.
	. "Chromosome" unique.	. Plusieurs chromosomes.
	. Pas de mitose.	. Equipartition des gênes réalisée par le phénomène de la mitose.
. CYTOPLASME	. Reticulum endoplasmique non individualisé	. Reticulum endoplasmique habituellement présent.
	. Pas de mitochondries mais des mésosomes.	. Mitochondries intracytoplasmiques.
	. Pas de plastes	. Parfois des plastes.
	. Pas de mouvements cytoplasmiques.	. Mouvements de cyclose.
. PARTICULARITES CHIMIQUES	. Mucopeptide pariétal	. Pas de mucopeptide pariétal
	. Pas de stérols	. Présence de stérols.

	Bactéries	Cellules Eucaryotes
. FLAGELLES		
. FLAGELLES	. Une seule fibrille	. Structure complexe comportant toujours un nombre constant de fibrilles. Deux fibrilles + Neuf paires périphériques.

VU et Permis d'imprimer :

Le PRESIDENT de la THESE :

R. F A S Q U E L L E

Le DOYEN de la FACULTE
de MEDECINE de PARIS :

C. B R O U E T

Le RECTEUR de l'ACADEMIE de PARIS :

J. R O C H E

BIBLIOGRAPHIE

1.- ABRAM, D.

Electron microscope observations on intacts cells, protoplasts and the cytoplasmic membrane of Bacillus Stearothermophilus.

J. Bact. 1965, 89, N°3, 855-873.

2.- ANACKER, R.L., FUKUSHI, K., PICKENS, E.G. and LACKMAN, D.B.

Electron microscopic observations of the development of Coxiella burnetii in the chick yolk sac.

J. Bact. 1967, 88, 4 , 1130-1138.

3.- ANACKER, R.L., PICKENS, E.G. and LACKMAN, D.B.

Details of the ultrastructure of R.prowazekii grown in the chick yolk sac.

J. Bact. 1967, 94, 1, 260-262.

4.- ANDERSON, D.R. and BARILLE, M.F.

Ultrastructure of Mycoplasma hominis.

J. Bact. 1965, 90, 1, 180-192.

5.- ARAKI, Y., SHIRAI, R., SHIMADA, A., ISHIMOTO, N. and ITO, E.

Enzymatic synthesis of cell wall mucopeptide in a particulate preparation of E. Coli.

Bioch. Bioph. Resear. Comm. 1966, 23, 4, 466-472.

6.- ARMSTRONG, J.A. and REED, S.E.

Fine structure of Lymphogranuloma Venereum agent and the effects of penicillin and 5-fluorouracil.

J. Gen. Microb. 1967, 16, 435-444.

7.- ASAKURA, S., EGUCHI, G. and IINO, T.

Reconstitution of bacterial flagella in vitro.

J. Mol. Biol. 1964, 10, 42-56.

8.- AVAKYAN, A.A., KATZ, L.N., LEVINA, K.N. and PAVLOVA, I.B.

Structure and composition of the Bacillus anthracis capsule.

J. Bact. 1965, 90, 4 , 1082-1095.

9.- BARKULIS, S.S., BOLTRALIK, J.J., HANKIN, H. and HEYMANN, H.

Biosynthesis of Streptococcal cell walls : N-acetyl-D-Muramic Acid.

J. Bact. 1967, 94, 4, 963-965.

10.- BARTHOLOMEW, J.W., CROMWELL, T. and GAN, R.

Analysis of the mechanism of gram differentiation by use of a filter paper chromatographic technique.

J. Bact. 1965, 90, 3, 766-777.

11.- BAYER, M.E.

Response of cell-walls of E.coli to a sudden reduction of the environmental osmotic pressure.

J. Bact. 1967, 93, 3, 1104-1112.

12.- BAYER, M.E.

The cell wall of E.coli : early effects of penicillin treatment and deprivation of diaminopimelic acid.

J. gen. Microb. 1967, 46, 237-246.

13.- BLADEN, H.A. and MERGENHAGEN, S.E.

Ultrastructure of Veillonella and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity.
J. Bact. 1964, 88, 5, 1482-1492.

14.- BODE, H.R.†, and MOROWITZ, H.J.

Size and structure of the Mycoplasma hominis H_{39} chromosome.

J. Mol. Biol. 1967, 23, 191-199.

15.- DE BOER, W.E. and SPIT, B.J.

A new type of bacterial cell wall structure revealed by replica technique.

J. Ant. v. Leeuw.-J. Microb. and Sero. 1964, 30, 3, 239-248.

16.- BURGE, R.E. and DRAPER, J.C.

The structure of the cell wall of the gram negative bacterium Proteus vulgaris.

J. Mol. Biol. 1967, 28, 173-210.

17.- CAIRNS, J. The bacterial chromosome.

Scientif. Ann. Janv. 1966.

18.- CARSON, K.J. and EAGON, R.G.

Lysozyme sensitivity of the cell wall of Pseudomonas aeruginosa : further evidence for the role of the non peptidoglycan components in cell wall rigidity.

Can. J. Microb. 1966, 12, 105-108.

19.- CHABBERT, Y.A.

Comportement des Staphylocoques vis à vis des antibiotiques.

Premier Colloque européen sur l'hospitalisme. PARIS, Déc. 1966.

20.- CHABBERT, Y.A.

Mécanisme d'action des antibiotiques.

Cours Inst. Pasteur, PARIS.

21.- CHRISTOL, D. Les variations des bactéries.

"Aux frontières de la Microbiologie médicale"

FLAMMARION, 1958.

22.- CHUNG, K.L. Autoradiographic studies of bacterial cell-wall replication. Cell-wall growth of Bacillus cereus in the presence of Chloramphenicol.

Can. J. Microb. 1967, 13, 341-350.

23.- COLE , R.M. Bacterial cell-wall replication followed by immunogluorescence.

Bact. Rev. 1965, 29, 3, 326-344.

24.- COTA-ROBLES, E.H.

Internal membranes in cells of E.coli.

J. Ultrast. Res. 1966, 16, 626-639.

25.- CUMMINS, C.S., ATFIELD, G., REES, R.J.W. and VALENTINE, R.C.

Cell wall composition in Mycobacterium lepraemurium.

J. Gen. Microb. 1967, 49, 377-384.

26.- DATTA, N., LAWN, A.M. and MEYNELL, E.

The relationship of F. type piliation and F.phage sensitivity to drug resistance transfer in R^+F^- E.coli K_{12}.

J. Gen. Microb. 1966, 45, 365-376.

27.- DOMERMUTH, C.H., NIELSEN, M., FREUNDT, E.A. and BIRCH-ANDERSEN, A.

Gross morphology and ultrastructure of Mycoplasma gallisepticum.

J. Bact. 1964, 88, 5, 1428-1432.

28.- DUGUID, J.P. and ANDERSON, E.S.

Terminology of bacterial fimbriae, or pili, and their types.
Nature, 1967, 215, 89-90.

29.- ERLANDSON, R.A. and ALLEN, E.G.

The ultrastructure of Meningopneumonitis.

Virology. 1964, 22, 410-418.

30.- FARSHTCHI, D. and Mac CLUNG, N.M.

Fine structure of Nocardia asteroïdes grown in chemically defined medium.

J. Bact. 1967, 94, 1, 255-257.

31.- FASQUELLE, R.

Bactériologie médicale.

FLAMMARION, Ed. 1965.

32.- FISCHMAN, D.A. and WEINBAUM, G.

Hexagonal pattern in cell-walls of E.coli.

Science. 1967, 155, 3761, 472-474.

33.- FITZ-JAMES, P.C.

Polyribosomes in protoplasts of B.megaterium.

Can. J. Microb. 1964, 10, 92-94.

34.- FITZ-JAMES, P.C.

Discussion for the fine structure and replication of bacterial nucleoïds.

Bact. Rev. 1965, 29, 3, 293-298.

35.- FORD, D.K. and Mac DONALD, J.

Morphology of human genital "T. strains". Pleuropneumonia like organisms.

J. Bact. 1963, 85, 3, 649-653.

36.- FUCHS, G.W.

Fine structure and replication of bacterial nucleoïds.

Bact. Rev. 1965, 29, 3, 277-293.

37.- GERENCSER, M.A. and SLACK, J.M.

Isolation and characterization of Actinomyces propionicus.

J. Bact. 1967, 94, 1, 109-115.

38.- GERHARDT, P.

Cytology of Bacillus anthracis.

Feder. Proceed. 1967, 26, 5, 1504-1517.

39.- GILBO, C.M., BEATON, C.D. and COLES, N.W.

Electron microscopy of the lysis of Staphylococcus aureus cell walls by Aeromonas lytic factor.

J. Bact. 1967, 93, 6, 1972-1975.

40.- GIROUD, P., JADIN, J., CREEMERS, J. et JADIN, M.J.

Ultrastructure des corps homogènes et des corps cloisonnés au cours des infections rickettsiennes.

C.R. Acad. Sc. PARIS, 1968, 266, 428-429.

41.- GOULD, G.W., HITCHINS, A.D. and KING, W.L.

Function and location of a "germination enzyme" in spores of B.cereus.

J. gen. Microb. 1966, 44, 293-302.

42.- HANDLEY, J., PARETSKY, D. and STUECKEMANN, J.

Electron microscopic observation of Coxiella burnetii in the Guinea pig.

J. Bact. 1967, 94, 1, 263-267.

43.- HAYFLICK and CHANOCK.

Mycoplasma species of man.

Bact. Rev. Juin 1965.

44.- HIGGINS, M.L., LECHEVALIER, M.P. and LECHEVALIER, H.

Flagellated Actinomycetes.

J. Bact. 1967, 93, 4 , 1446-1451.

45.- HILL, M.J.

Action of Bile salts on bacterial cell-walls.

Nature. 1967, 214, 5093, 1152-1154.

46.- HODGKISS, W., ORDAL, Z.J. and CANN, D.C.

The morphology and ultrastructure of the spore and exosporium of some Clostridium species.

J. Gen. Microb. 1967, 47, 213-225.

47.- HOENIGER, J.F.M., VAN ITERSON, W., and VAN ZANTEN, E.N.

Basal bodies of bacterial flagella in Proteus mirabilis. Electron microscopy of negatively stained material.

J. Cell. Biol. 1966, 31, 3, 603-618.

48.- HOLT, S.C. and CANALE-PAROLA, E.

Fine structure of Sarcina maxima and Sarcina ventriculi.

J. Bacter. 1967, 93, 1, 399-410.

49.- HUBBERT, A., LECHEVALIER and LECHEVALIER M. P.

Biology of Actinomycetes.

An. Rev. Microb. 1967, 21, 71-100.

50.- JACOB, F., RYTER, A. and CUZIN, F.

On the association between D N A and membrane in bacteria.

Proc. Roy. Soc. 1966, 164, 267-278.

51.- KAWATA, T. and INOUE, T.

Ultrastructure of Nocardi asteroïdes as revealed by electron microscopy.

Jap. J. Microb. 1965, 9, 101-114.

52.- KONDO, M. and FOSTER, J.W.

Chemical and electron microscope studies on fractions prepared from coats of Bacillus spores.

J. Gen. Microb. 1967, 47, 257-271.

53.- LARK, K.G.

Regulation of Chromesome replication and segregation in bacteria.

Bact. Rev. 1966, 30, 1, 3-32.

54.- LAWN, A.M.

Morphological features of the pili associated with E. coli K_{12} carrying R.factors or the F. factor.

J. Gen. Microb. 1966, 45, 377-383.

55.- LECHEVALIER, H. et LECHEVALIER, M.P.

Classification des Actinomycetes aerobies basées sur leur morphologie et leur composition chimique.

Ann. Inst. Pasteur. 1965, 108, 662-673.

56.- LECHEVALIER, M., LECHEVALIER, M.P. and BECKER, B.

Comparison of the chemical composition of cell-walls of Nocardiae with that of other aerobic Actinomycetes.

Inst. J. Syst. Bact.1966, 16, 2, 151-160.

57.- LISTGARTEN, M.A. and SOCRANSKY, S.S.

Electron microscopy of axial fibrils, outer envelope, and cell division of certain oral spirochetes.

J. Bact. 1964, 88, 4, 1087-1103.

58.- LOWY, J. and HANSON, J.

Electron microscope studies of bacterial flagella

J. Mol. Biol. 1965, 11, 293-313

59.- MANILOFF, J., MOROWITZ, H.J. and BARNETT, R.J.

Studies of the ultrastructure and ribosomal arrangements of the P P L O. A_{5969}

J. Cell. Biol. 1965, 25, 1, 139-150.

60.- MANILOFF, J., MOROWITZ, H.J. and BARNETT, R.J.

Ultrastructure and ribosomes of Mycoplasma gallisepticum.

J. Bact. 1965, 90, 1, 193-204.

61.- MARTIN, H.H.

Murein structure in cell.walls of normal bacteria and L. forms of Proteus mirabilis and the site of action of penicillin.

Acad. Sc. Bohem.- Fol. Microb. 1967, 12, 234-239.

62.- MERGENHAGEN, S.E., BLADEN, H.A. and HSU, K.C.

Electron micoroopic localization of endotoxic lipopolysaccharide in Gram negative bacteria.

Ann. New York Acad. Sc. 1966, 133, 279-291.

63.- MIRELMAN, d. and SHARON, N.

Isolation and study of the chemical structure of low molecular weight glycopeptides from Micrococcus lysodeikticus cell walls.

J. Biol. Chem. 1967, 242, 15, 3414-3427.

64.- MOBERLY, B.J., SHAFA, F and GERHARDT, P.

Structural details of anthrax spores during stages of transformation into vegetative cells.

J. Bact. 1966, 92, 1, 220-228.

65.- MONTGOMERIE, J.Z., KALMANSON, G.M. and GUZE, L.B.

Effect osmotic stabilizer on protoplasts and bacterial forms of Str. faecalis.

J. Lab. Clin. Med. St-Louis, 1967, 70, 539-553.

66.- MOULDER, J.W.

The relation of the Psittacosis group to bacteria and viruses.

An. Rev. Microb. 1966, 20, 107-130.

67.- MYERS The presence of D A P in the Rickettsiae.

P.S.E.B.M. 1967.

68.- NANNINGA, N.

Fine structure observed in 50 S ribosomal subunits of Bacillus subtilis.

J. Coll. Biol. 1967, 33, 2, C_1 C_6.

69.- NATIVELLE

Répercussions pratiques de la connaissance des formes L et du cycle L des bactéries.

Rev. Prat. 21 Juin 1961.

70.- NEIMARK, H.

Heterogeneity among the Mycoplasma and relationships to bacteria.

Ann. NEW YORK. Acad. Scie. 1967, 143, 31-37.

71.- NERMUT, M.V.

The ultrastructure of the cell-wall of Bacillus megaterium.

J. Gen. Microb. 1967, 19, 503-512.

72.- NERMUT, M.V. and MURRAY, R.G.E.

Ultrastructure of the cell wall of Bacillus polymyxa

J. Bact. 1967, 93, 6, 1949-1965.

73.- PANOS, C. L-forms, lipid alterations and inhibition of cell-wall biosynthesis.

Ann. NEW YORK. Acad. Scie. 1967, 143, 152-157.

74.- PERKINS, H.R.

2,6 - Diamino - 3 - hydroxypimelic acid in microbial cell-wall mucopeptide.

Nature, 1965, 208, 5013, 872-873.

75.- PERKINS, H.R.

Inhibition of lysozyme by positively charged groups in the mucopeptide of the bacterial cell-wall.

Proceed. Roy. Soc. 1967, B, 167, 443-445.

76.- PERKINS, H.R. and ALLISON, A.C.

Cell wall constituents of Rickettsiae and Psittacosis Lymphogranuloma organisms.

J. gen. Microb. 1963, 30, 469-480.

77.- de PETRIS - Ultrastructure of the cell-wall of E.coli.

J. Ultr. Res. 1965, 12, 247-262.

78.- PFISTER, R.M. and LUNDGREN, D.G.

Electron microscopy of polyribosomes within Bacillus cereus.
J. Bact. 1964, 88, 4, 1119-1129.

79.- PHILLIPS, D.M.

Substructure of flagellar tubules.

J. cell. Biol. 1966, 31, 3, 635-638.

80.- PIECHAUD, M.

Coloration des corps chromatiques des Entérobactériacées par un colorant neutre sans hydrolyse préalable.

Ann. Inst. Pasteur, 1949, 76, 66-67

81.- PIECHAUD, M.

La coloration sans hydrolyse du noyau des bactéries.

Ann. Inst. Pasteur, 1954, 86, 787-793.

82.- PILLOT, J.

Contribution à l'étude du genre Treponema - Structures anatomique et antigénique.

Thèse Doctorat Sciences Naturelles, PARIS, 1965.

83.- PILLOT, J. et RYTER, A.

Structure des Spirochètes. Etude des genres Treponema Borrelia et Leptospira au microscope électronique.

Ann. Inst. Past. 1965, 108, 791-804

84.- PLAPP, R., SCHLEIFFER, K.H. and KANDLER, O.

The amino-acid sequence of the mureïns of lactic Acid Bacteria.

Fol. Microb. 1967, 12, 205-213.

85.- PRITCHARD, R.H.

Structure and replication of the bacterial chromosome.

Br. Med. Bul. 1965, 21, 3, 203-205.

86.- RAZIN, S. Factors influencing osmotif fragility of Mycoplasma.

J. Gen. Microb. 1964, 36, 451-459.

87.- RICHTER, G.W. and KRESS, Y.

Electron microscopy of a strain of Bordetella Bronchiseptica.

J. Bact. 1967, 94, 4, 1216-1224.

88.- RODE, L.J., CRAWFORD, M.A. and WILLIAMS, M.C.
Clostridium spores with ribbon like appendages.
J. Bact. 1967, 93, 3, 1160-1173.

89.- ROGERS, H.J.
The structure and biosynthesis of the components of the cell-walls of gram positive bacteria.
Acad. Scient. Bohemosl - Fol.Microb.1967,12,191-200.

90.- ROUX La multiplication des formes L.
Ann. Inst. Past. 1960, 99, 286-296.

91.- ROUSSEAU, M., FLECHON, J. et HERMIER, J.
Etude au microscope électronique de la germination de la spore chez B. subtilis.
Ann. Inst. Past. 1966, 111, 149-160.

92.- RUPLEY, J.A. The binding and cleavage by lysozyme of N-acetyl glucosamine oligosaccharides.
Proceed. Roy. Soc. 1967, B, 167, 416-428.

93.- RYTER, A Etude au microscope électronique du noyau bactérien et de sa liaison avec la membrane cytoplasmique.
Path. Biol. 1965, 13, 252-263.

94.- RYTER, A. Etude morphologique de la sporulation de B.subtilis.
Ann. Inst. Past. 1965, 108, 40-60.

95.- RYTER, A. Relationship between synthesis of the cytoplasmic membrane and nuclear segregation in B. subtilis.
Acad. Scient. Bohemosl. - Fol. Microb.1967, 12, 283-290.

96.- RYTER, A., BEN BLOOM et AUBERT, J.P.

Localisation intracellulaire des acides ribonucléiques synthétisés pendant la sporulation chez B. subtilis.

C.R. Acad. Sc. PARIS, 1966, 262, 1305-1307.

98.- RYTER, A. et JACOB, F.

Etude au microscope électronique de la liaison entre noyau et mésosome chez B.subtilis.

Ann. Inst. Past. 1964, 107, 384-400.

99.- RYTER, A. et JACOB, F.

Etude morphologique de la liaison du noyau à la membrane chez E.coli et chez les protoplastes de B. subtilis.

Ann. Inst. Past. 1966, 110, 801-812.

100.- RYTER, A. et KELLENBERGER, E.

Etude au microscope électronique de plasmas contenant du D.N.A.

Z. Naturforsch. 1958, 13 b, 597.

101.- RYTER, A. and KELLENBERGER, E.

J. Ultr. Res. 1958, 2, 200.

102.- RYTER, A. and LANDMAN, O.E.

Electron microscope study of the relationship between mesosome loss and the stable L state (or protoplast state) in Bacillus subtilis.

J. Bact. 1964, 88, 2, 457-467.

103.- RYTER, A. et PIECHAUD, M.

Etude au microscope électronique de quelques souches de Moraxella.
Ann. Inst. Past. 1963, 105, 1071-1079.

104.- RYTER, A. et PILLOT, J.

Etude au microscope électronique de la structure externe et interne du Tréponème Reiter.

Ann. Inst. Past.1963, 104, 496-501.

105.- RYTER, A. et PILLOT, J.

Structure des spirochètes. Etude du genre Critispira au microscope optique et au microscope électronique.

Ann. Inst. Past. 1965, 109, 552-562.

106.- RYTER, A. et SZULMAJSTER, J.

Action du chloramphenicol sur la sporopénèse de B. subtilis.

Ann. Inst. Past. 1965, 108, 640-651.

107.- SALTON, M.R.J.

Structure and function of bacterial cell membranes.

Ann. Rev. Microb. 1967, 21, 417-442.

108.- SCHLESSINGER, D., MARCHESI, V.T. and KWAN, B.C.K.

Binding of ribosomes to cytoplasmic reticulum of Bacillus megaterium.

J. Bact. 1965, 90, 2, 456-466.

109.- SCHMIDT, J.M. and STANIER, R.Y.

The development of cellular stalks in bacteria.

J. Cell. Biol. 1966, 28, 3, 423-436.

110.- SCHUSTER, C.S., HAYASHI, J.A. and BAHN, A.N.

Toxic properties of the cell-wall of Gram positive bacteria.

J. Bact. 1967, 93, 1, 47-52.

111.- SCHWARZ, U. and LEUTGEB, W.

In vivo studies on murein synthesis.

Acad. Scient. Bohemosl. Fol. Microb. 1967, 12, 279-282.

112.- SEDAR, A.W. and BURDE, R.M.

The demonstration of the succinic dehydrogenase system in B. subtilis using tetranitro-bloc-tetrazolium combined with techniques of electron microscopy.

J. Cell. Biol. 1965, 27, 1, 53-66.

113.- SHANDS, J.W.

Localization of somatic antigen on gram-negative bacteria by electron microscopy.

J. Bact. 1965, 90, 1, 266-270.

114.- SHANDS, J.W.

Localization of somatic antigen on gram negative bacteria using ferritin antibody conjugates.

Ann. NEW YORK Acad. Sc. 1966, 292-298.

115.- SHARON, N. The chemical structure of Lyzozyme substrates and their cleavage by the enzyme.

Proceed. Roy. Soc. 1967, 167, 402-415.

116.- SHOCKMAN, G.D.

Unbalanced cell-wall synthesis : autolysis and cell-wall thickening.

Bact. Rev. 1965, 29, 3, 345-358.

117.- SILVA, M.T.

Electron microscopic study on the effect of the oxidation of ultrathin sections of B.cereus and B. megaterium.

J. Ultrast. Res. 1967, 18, 345-353.

118.- SMITH Comparative physiology of P.P.L.O. and L.type organisms.

Bact. Rev. Juin 1964.

119.- STANIER, R.Y.

La place des bactéries dans le monde vivant.

Ann. Inst. Past. 1961, 101, 297-312.

120.- STANIER, R.Y., DOUDOROFF, M. and ADELBERG, E.A.

The microbial world. 1963, Prentice-Hall.Inc.

121.- STARKA, I. and MORAVOVA, J.

Cellular division of penicillin induced filaments of E. Coli.
Acad. Scient. Bohemosl.- Fol.Microb. 1967, 12, 240-247.

122.- STEED, P. and MURRAY, R.G.E.

The cell-wall and cell division of Gram negative bacteria.

Can. J. Microb. 1966, 12, 263-270.

123.- STROMINGER, J.L. and GHUYSEN, J.M.

Mechanisms of enzymatic bacteriolysis.

Science. 1967, 156, 3772, 213-221.

124.- STROMINGER, J.L. and TIPPER, D.J.

Bacterial cell wall synthesis and structure in relation to the mechanism of action of penicillins and other antibacterial agents.

Am.J. Med. 1965, 39, 5, 708-719.

125.- TAKAGI, A., NAKAMURA, K. and UEDA, M.

Electron microscope studies of the intracytoplasmic membrane system in Clostridium tetani and Clostridium botulinum.
Jap. J. Microb. 1965, 9, 131-143.

126.- TULASNE, R., MINCK, R., KIRN, A. et KREMBEL, J.

Délimitation de la notion des formes L. des bactéries : protoplastes, sphéroplastes et formes L.

Ann. Inst. Past. 1960, 99, 859-874.

127.- TULASNE, R.

Bactériophages et formes L. des bactéries.

Ann. Inst. Past. 1965, 108, 33-39

128.- VAN ITERSON, W.

Bacterial cytoplasm.

Bact. Rev. 1965, 29, 3, 299-325.

129.- VAN ITERSON, W.

The fine structure of ribo-nucleoprotein in bacterial cytoplasm.

J. Cell. Biol. 1966, 28, 3, 563-570.

130.- WEIBULL, C.

Plasmolysis in B. megaterium.

J. Bact. 1965, 89, 4, 1151-1154.

131.- WELSCH, M.

Bacteriolyse et parois cellulaires bactériennes.

Path. Microb. 1966, 29, 571-601.

132.- WILLIAMS, S.T.

Sensitivity of Streptomycetes to antibiotics as a taxonomic character.

J. gen. Microb. 1967, 46, 151-160.

133.- WOLFGANG FUHS, G.

Fine structure and replication of bacterial nucleoids.

Bact. Rev. 1965, 29, 3, 277-293.

134.- WOOD JR, W.H. and WISSEMAN JR

The cell wall of Rickettsia mooseri.

J. Bact. 1967, 93, 3, 1113-1118.

135.- ZWILLENBERG, L.O.

Electron microscopic features of Gram negative and Gram positive bacteria embedded in phosphotungstate.

J. Ant. Leeuw. - J. Micro. and Sero. 1964, 30, 2, 154-162.